



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Aislamiento, caracterización y actividad antibiótica de
actinomicetos marinos frente a patógenos
multidrogoresistentes de origen clínico**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Jorge LEÓN QUISPE

ASESOR

Dra. Susana Mónica GUTIÉRREZ MORENO

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

León, J. (2024). *Aislamiento, caracterización y actividad antibiótica de actinomicetos marinos frente a patógenos multidrogoresistentes de origen clínico*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jorge León Quispe
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06451156
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5865-5374
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Susana Mónica Gutierrez Moreno
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08060631
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7885-7384
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Ruth Hortensia García de la Guarda
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06041081
Miembro de Jurado	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15725076
Miembro del Jurado	
Nombres y apellidos	Báslavi Marisbel Cóndor Luján
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43644365
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Obligatorio. Nombres y apellidos completos según aparecen en el documento de identidad. No debe registrar los de nombres asesores, directores de escuela o unidades de posgrado. Este campo es solo para miembros de jurado.

Tipo de documento	Obligatorio. Elegir un solo tipo de documento: DNI, Carné de extranjería emitido en Perú, Pasaporte, Cédula de identidad
Número de documento de identidad	Obligatorio. Usar solo un número de identificación según corresponda. En el caso de jurados extranjeros con pasaporte o cédula de identidad, anteponer el código ISO-3166 de país al número de documento de identidad y separar ambos datos mediante una barra lateral: BR / AB000421 CO / 9955249956
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.1.2
Grupo de investigación	Recursos Naturales y Bioactivos (RENABIO)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Posgrado 2017 para docentes- Doctorado. Proyecto B17100116a (RR N° 06369-R-17)
Ubicación geográfica de la investigación	Perú, Lima, Lima, Lima Coordenadas: 12°2'35.4" S 77°1'41.7" O
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2017 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Otras ciencias naturales https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.07.00



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N.º 066-UPG-FCB-2024

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Siendo las 16:00 horas del día 04 de marzo de 2024, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis conformado por:

Dra. Ruth Hortensia García de la Guarda	(Presidente)
Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández	(Miembro)
Dra. Báslavi Marisbel Cóndor Luján	(Miembro)
Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara el señor Magíster: **JORGE LEÓN QUISPE**.

Después de darse lectura al **Expediente N.º 066-UPG-FCB-2024**, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE ACTINOMICETOS MARINOS FRENTE A PATÓGENOS MULTI-DROGRESISTENTES DE ORIGEN CLÍNICO”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

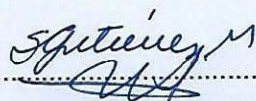
Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Excelente*.....con la nota aprobatoria de *Diecinueve (19)*


A continuación, la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, al señor Magíster **JORGE LEÓN QUISPE**.

Siendo las *19:00hr.* se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 04 días del mes de marzo del año 2024.


.....
Dra. Ruth H. García de la Guarda
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE
rgarciad@unmsm.edu.pe
RENACYT P0001951


.....
Dra. Susana M. Gutiérrez Moreno
Profesora Principal T.C.
ASESORA
sgutierrezm@unmsm.edu.pe
RENACYT P0003854


.....
Dr. Abelardo L. Maturrano Hernández
Profesor Principal a D.E.
MIEMBRO
amaturrano@unmsm.edu.pe
RENACYT P0000200


.....
Dra. Báslavi M. Cóndor Luján
Profesora Auxiliar a T.C.
MIEMBRO
bcondorl@unmsm.edu.pe
RENACYT P0019180



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, SUSANA MÓNICA GUTIÉRREZ MORENO en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 000156-2024-D-FCB/UNMSM de la tesis cuyo título es :”AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE ACTINOMICETOS MARINOS FRENTE A PATÓGENOS MULTIDROGO-RESISTENTES DE ORIGEN CLÍNICO” presentado por el Magíster JORGE LEÓN QUISPE para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 5.% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Firma del Asesor

DNI: 08060631

Nombres y apellidos del asesor: Susana Mónica Gutiérrez Moreno



AGRADECIMIENTOS

- Al Programa de Promoción de Tesis de Posgrado 2017 para docentes-Doctorado del Vicerrectorado de investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Proyecto B17100116a por el apoyo financiero recibido para lograr la culminación de esta investigación.
- A mi primer asesor de tesis, el Doctor Abad Flores Paucarima, por su amistad, sus consejos, su disposición mostrada y su gran espíritu de colaboración en la realización de este trabajo.
- A la Doctora Susana Mónica Gutierrez Moreno por su apoyo y buena disposición para asumir la función de asesora de tesis ante la eventualidad de no seguir contando con el apoyo del Doctor Abad Flores y poder de esta manera continuar hasta la culminación del presente trabajo de investigación.
- A los miembros del jurado por sus acertadas correcciones y recomendaciones oportunas para mejorar la presentación de la presente tesis.
- A todos los ayudantes y tesistas del Laboratorio Ecología Microbiana, por estar siempre prestos a colaborar en las actividades de investigación, en especial a Juan José Aponte Ubillus, Nadia Galindo Cabello y Junior Caro Castro, ex tesistas del Laboratorio y ahora colegas, quienes mostraron mucha paciencia, voluntad y disposición para atender mis dudas y preguntas sobre todo de aspectos de biología molecular.
- Un agradecimiento especial a mis amigos y colegas Dr. Emilio Marguet y Dra. Marisol Vallejo de la Universidad Nacional de la Patagonia – Argentina, por su valioso apoyo logístico; al Dr. Hinsby Cadillo Quiróz de Arizona State University, por su apoyo en la secuenciación de cepas; a la Dra. Báslavi Condor Lujan por su apoyo en la obtención de las muestras de esponjas y su identificación. Asimismo, un agradecimiento especial a la Blga. Sara Tupa Andrade y Blga. Carolina Quispe Soto por su apoyo logístico en el laboratorio.
- A todas y todos mis amigos y colegas que de una u otra manera me manifestaron palabras de ánimo para culminar con la tesis.
- A mi familia, Dora María mi esposa, Juliana y Patricia mis hijas, Camila, Vannia mis queridas nietas y Benjamín el último nieto; a todos por su paciencia, comprensión, aliento y apoyo en todo lo que he necesitado para poder cumplir con esta meta postergada por varios años.

IN MEMORIAM

- A mi recordada madre doña Maximiliana Quispe Alegría (†) quien me dio la vida y su amor incalculable en todo momento; por enseñarme con sobriedad que solo con sacrificio y paciencia se alcanzan metas para ser personas útiles a la sociedad, propiciando siempre la armonía familiar para mantenernos siempre unidos.
- A mi querido padre don Juan Francisco León Oscco (†) por haberme transmitido con sapiencia sus virtudes y los valores humanos más importantes y sembrar en mí la semilla de la humildad, el respeto al prójimo, la gratitud y la honestidad para alcanzar la libertad a través de sus sabios consejos.

DEDICATORIA

A mis padres, Maximiliana y Francisco, siempre presentes en mi memoria, por haberme brindado su inmenso amor y dejarme la mejor herencia de padres a hijos: la educación.

A mis hijas Juliana y Patricia, por su amor incondicional y la sabiduría para alentarme y animarme constantemente para alcanzar esta meta.

A mis nietas Camila y Vannia, así como al nieto más engreído Benjamín por ser la alegría del hogar.

A mi esposa Dora María, por darme siempre su apoyo, aliento y excelente compañía

A mi querida maestra, colega y amiga Blga. Amabilia Vilcapoma Segovia, por su constante apoyo en la docencia e investigación en las Ciencias Microbiológicas.

Al Dr. Juan Tarazona Barboza (†), biólogo marino, investigador excepcional y perseverante, líder de estudios de ecología marina; quien gentilmente, a través de su grupo de investigación Desarrollo Pesquero en áreas Someras del Ecosistema de Afloramiento (DePSEA) facilitó la toma de muestras de sedimento marino.

Al Dr. Rito Zerpa Larrauri (†), destacado médico patólogo, académico y reconocido investigador científico en el área de la microbiología clínica, por su constante apoyo en proporcionar cepas de origen hospitalaria.

Al Dr. Patricio García – Tello Olivares (†), mi asesor de tesis en la Maestría en Ciencias Microbiológicas en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso – Chile entre 1994-1997, quien me enseñó las pautas para realizar investigación tanto en el laboratorio como en el campo, ¡un verdadero maestro!

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES	3
2.1.	Ecosistema marino y actinobacterias	3
2.2.	Phylum Actinobacterias (hoy Phylum Actinomycetota).....	6
2.3.	Taxonomía e identificación de las Actinobacterias	8
2.4.	Clasificación Molecular de Actinobacterias	13
2.5.	Actinobacterias y su distribución	15
2.5.1.	Actinobacterias en ecosistemas marinos.....	16
2.5.1.1.	Actinobacterias en sedimentos marinos	21
2.5.1.2.	Actinobacterias en esponjas marinas.	24
2.6.	El género dominante - <i>Streptomyces</i>	25
2.6.1.	<i>Streptomyces</i> como fuente de metabolitos bioactivos de origen marino	26
2.6.2.	<i>Streptomyces</i> de sedimento marino y sus compuestos antimicrobianos	27
2.6.3.	<i>Streptomyces</i> de esponjas marinas y su actividad antimicrobiana	29
2.7.	Perspectivas de las actinobacterias marinas.	31
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	34
3.1.	HIPÓTESIS	34
3.2.	Objetivos.....	34
3.2.1.	Objetivo General	34
3.2.2.	Objetivos específicos.....	34
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	35
4.1.	Material biológico	35
4.2.	Cepas de microorganismos indicadores	35
4.3.	Lugares de colecta.....	36
4.3.1.	Muestreo de sedimento marino.....	36
4.3.2.	Muestreo de esponjas	37
4.4.	Procesamiento de muestras de sedimento y aislamiento de actinomicetos ..	40
4.5.	Procesamiento de muestras de esponjas y aislamiento de actinomicetos	40
4.6.	Caracterización de cultivos de actinomicetos	40
4.7.	Determinación del perfil de resistencia antibiótica de cepas indicadoras	41
4.8.	Determinación de la actividad antimicrobiana.....	41
4.8.1.	Mantenimiento de cepas indicadoras.....	41
4.8.2.	Tamizaje preliminar de la actividad antibacteriana	42
4.8.3.	Tamizaje preliminar de la actividad antifúngica	42

4.8.4.	Determinación del porcentaje inhibitorio de actinomicetos aislados	43
4.9.	Fermentación, extracción y pruebas de actividad antimicrobiana del extracto crudo.....	43
4.9.1.	Prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en placas	44
4.9.2.	Prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución	44
4.10.	Identificación de actinomicetos seleccionados mediante secuenciación del RNAr 16S	45
4.11.	Crecimiento y actividad inhibitoria de actinomicetos en presencia y ausencia de agua de mar.	47
4.12.	Observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).....	48
4.13.	Identificación de las esponjas	49
4.14.	Análisis de datos	49
V.	RESULTADOS.....	50
5.1.	Enriquecimiento y aislamiento de actinomicetos de sedimento marino	50
5.2.	Características culturales de actinomicetos de sedimento marino.....	50
5.3.	Perfil de resistencia antibiótica de cepas patógenas indicadoras de la actividad inhibitoria de actinomicetos.	56
5.4.	Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de sedimento marino....	58
5.4.1.	Tamizaje preliminar de actividad antibacteriana.....	58
5.4.2.	Tamizaje de actividad antibacteriana frente a cepas estándar MDR.....	60
5.4.3.	Tamizaje de actividad antibacteriana a patógenos MDR Gram negativos..	63
5.4.4.	Tamizaje de actividad antibacteriana frente a patógenos MDR Gram positivos.....	65
5.4.5.	Actividad antibacteriana de actinomicetos aislados de esponjas.....	66
5.5.	Obtención de extractos crudos y actividad antimicrobiana.....	69
5.6.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del actinomiceto cepa M10-77	71
5.7.	Actividad anti- <i>Candida albicans</i>	73
5.8.	Análisis filogenético de cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de sedimento marino.....	75
5.9.	Análisis filogenético de cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de esponjas marinas	79
5.10.	Observaciones por Microscopía Electrónica de Barrido	81
5.11.	Crecimiento y actividad antimicrobiana de los actinomicetos cultivados en presencia/ausencia de agua de mar.	84
5.12.	Identificación de esponjas	87
VI.	DISCUSIÓN	89

6.1.	Aislamiento y caracterización de colonias de actinomicetos de sedimento marino.....	90
6.2.	Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de sedimento marino	95
6.3.	Actividad anti- <i>Candida</i> de actinomicetos aislados de sedimento marino.....	99
6.4.	Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de esponjas marinas ..	103
VII.	CONCLUSIONES	109
VIII.	RECOMENDACIONES.....	110
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
X.	ANEXO.....	147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies nuevas de actinomicetos “raros” (no <i>Streptomyces</i>) de sedimentos marinos reportados entre 2013 - 2017 (Adaptado de: Subramani & Sipkema, 2019).. 23	
Tabla 2. Especies nuevas de actinomicetos “raros” simbióticos de esponjas marinas notificados durante el período de 2013 a 2017 (Fuente: Subramani & Sipkema, 2019).	25
Tabla 3. Especies nuevas de <i>Streptomyces</i> aislados de sedimento marino y sus compuestos antimicrobianos (2015-2019) (Adaptado de Wang <i>et al.</i> , 2020).....	28
Tabla 4. Especies nuevas de <i>Streptomyces</i> spp. de sedimento marino (2015 - 2020). (Fuente: Donalds <i>et al.</i> , 2022).....	29
Tabla 5. Especies nuevas de <i>Streptomyces</i> spp. de algunos vertebrados e invertebrados marinos (2015 - 2020) (Fuente: Donalds <i>et al.</i> , 2022).....	30
Tabla 6. Lugares de colecta de sedimentos para el aislamiento de actinomicetos.....	37
Tabla 7. Lugares de colecta de esponjas para el aislamiento de actinomicetos marinos.	39
Tabla 8. Características culturales de actinomicetos (n=62) de sedimento marino.	51
Tabla 9. Perfil de resistencia antibiótica de dos cepas patógenas MDR (*), utilizados como testigos en las pruebas de actividad antimicrobiana de los actinomicetos.	56
Tabla 10. Perfil de resistencia antibiótica de patógenos MDR Gram negativos (Proporcionados por el Hospital Casimiro Ulloa).	57
Tabla 11. Perfil de resistencia antibiótica de patógenos MDR Gram positivos (proporcionados por el Hospital Casimiro Ulloa) utilizados como cepas testigo en las pruebas de actividad antimicrobiana de los actinomicetos.....	58
Tabla 12. Actividad inhibitoria de actinomicetos marinos (n=62) frente a dos bacterias MDR y <i>Candida albicans</i> de origen clínico.	59
Tabla 13. Actividad antimicrobiana (expresado en mm de diámetro de halos de inhibición) y porcentajes (%) de inhibición (*) de actinomicetos de sedimento marino frente a cepas estándar de <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> y una cepa peruana de <i>S. aureus</i> MDR.	60
Tabla 14. Actividad antimicrobiana de cepas seleccionadas de actinomicetos (aislados de sedimento marino) frente a patógenos Gram negativos MDR de origen clínico.	64
Tabla 15. Actividad antimicrobiana de cepas seleccionadas de actinomicetos marinos frente a patógenos Gram positivos MDR de origen clínico.	66
Tabla 16. Actinomicetos aislados de esponjas (n=37) y su actividad antimicrobiana frente a bacterias uropatógenas drogorresistentes (expresado como % de inhibición).	67
Tabla 17. Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos crudos de actinomicetos marinos seleccionados (método de inoculación directa).	70
Tabla 18. Actividad inhibitoria del extracto diclorometánico (20 mg/ml) de la cepa M10-77 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (método de difusión en “pocillo”). ...	70
Tabla 19. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto diclorometánico de la cepa M10-77 frente a <i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA) (Método de difusión en “pocillo”).	72
Tabla 20. Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL) de los extractos de la cepa M10-77.	73
Tabla 21. Actividad antifúngica (expresada como halos de inhibición) de actinomicetos marinos (n=20) frente a cepas de <i>Candida albicans</i> de origen clínico.	74

Tabla 22. Resultado del análisis filogenético de cinco cepas seleccionadas de actinomicetos que fueron aislados de sedimento marino de la costa central de Perú.	77
Tabla 23. Identificación filogenética de cepas seleccionadas de <i>Streptomyces</i> , aisladas de esponjas del género <i>Haliclona</i> sp. colectadas en la localidad de San Juan de Marcona (Ica).	79
Tabla 24. Crecimiento de actinomicetos y su actividad antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> ATCC 43300 en cultivos preparados con agua de mar (AM) y agua desionizada (AD).	86
Tabla 25. Descripción de las esponjas marinas colectadas en Pucusana (Lima) y San Juan de Marcona (Ica), 2018.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de actinomicetos, desde conidiosporas hasta esporulación. Los distintos tipos de conidiosporas se muestran en el cuadro ampliado (Fuente: Ngamcharungchit <i>et al.</i> , 2023).	10
Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de los actinomicetos (Fuente: Barka <i>et al.</i> , 2016).	11
Figura 3. Dibujos de varios tipos de esporas producidas por actinomicetos (Fuente: Barka <i>et al.</i> , 2016).	12
Figura 4. Árbol filogenético basado en la secuenciación de los genes rRNA 16S del Orden Actinomycetales (Fuente: Barka <i>et al.</i> , 2016).	15
Figura 5. Fuentes de aislamiento de actinobacterias marinas con actividad antimicrobiana (De la Hoz Romo <i>et al.</i> , 2022).	19
Figura 6. Publicaciones sobre actinobacterias marinas entre 2002 – 2022 (Fuente: De la Hoz Romo <i>et al.</i> , 2022).	19
Figura 7. Géneros predominantes de actinobacterias de origen marino con actividad antimicrobiana (2002 – 2022) (Fuente: De la Hoz Romo <i>et al.</i> , 2022).	20
Figura 8. Disolventes orgánicos utilizados en la obtención de extractos crudos con actividad antimicrobiana (2002 – 2022) (Fuente: De la Hoz Romo <i>et al.</i> , 2022).	20
Figura 9. Principales actinobacterias productoras de metabolitos bioactivos, aisladas de sedimento marino (Fuente: Sharma Swati <i>et al.</i> , 2019).	22
Figura 10. Principales aplicaciones de las actinobacterias marinas y perspectivas de uso en el futuro (Fuente: Jagannathan <i>et al.</i> , 2021).	33
Figura 11. Lugares de colecta de sedimento marino frente a Ancón – Lima. A: Playa San Francisco (15 y 34 m de profundidad); B: Isla “las Panchas” (100 m de profundidad) (Fuente: Google Earth)	36
Figura 12. Lugares de colecta de muestras de sedimento en Paracas (Ica – Perú). A: Isla La Vieja; B: Bahía Independencia. (Fuente: Google Earth).	37
Figura 13. Lugar de colecta de esponjas en la playa las Ninfas en Pucusana (Lima – Perú).	38
Figura 14. Lugares de colecta de esponjas marinas en la playa Hermosa de Marcona (Ica – Perú). A: Orilla rocosa; B: rocas sumergidas (Fuente: Google Earth).	38
Figura 15. Muestreo en la orilla rocosa en playa Hermosa – San Juan de Marcona, Ica – Perú.	39
Figura 16. Pigmentación de colonias de actinomicetos aislados de sedimento marino colectado frente a Ancón (Lima) y bahía de Independencia (Ica).	52
Figura 17. Diversidad de colonias de actinomicetos aislados de sedimento marino de la costa central del Perú (Bahías de Ancón e Independencia).	52
Figura 18. Colonias de actinomicetos de sedimento marino en Agar Starch M Protein (no descrito en el presente trabajo), identificadas como <i>Streptomyces</i> sp. M11-116 (A , A1), <i>Streptomyces</i> sp. MC-300 (B , B1), <i>Streptomyces</i> sp. M11-106 (C , C1) y <i>Streptomyces erythrogriseus</i> M10-77 (D , D1).	53
Figura 19. Observación microscópica (coloración Gram) de la estructura filamentosa de los micelios y cadena de esporas de actinomicetos marinos. A: cepa M10-77; B: M11-120; C: II-300B; D: III-434B, identificados como <i>Streptomyces</i> sp. Aumento: 1000X.	55

Figura 20. Microfotografía de la cadena de esporas del actinomiceto cepa M10-77, aislada de sedimento colectado a 34 m de profundidad en la Bahía de la Independencia (Paracas – Ica). Aumento: 3000x.....	55
Figura 21. Perfil de resistencia antibiótica mostrada por dos cepas MDR, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A) y <i>Staphylococcus aureus</i> (B).....	57
Figura 22. Actividad antimicrobiana de dos actinomicetos marinos frente a cepas MDR de <i>Staphylococcus aureus</i> . Cepa estándar (A) y cepa peruana (B).....	61
Figura 23. Actividad antimicrobiana de dos actinomicetos de sedimento marino frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 143300 drogorresistente.....	61
Figura 24. Actividad antimicrobiana de dos cultivos de actinomicetos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> 1094 (A) y de tres cultivos frente a <i>Enterococcus</i> sp. 239 (B). En esta última la inhibición es total que no permitió el crecimiento del patógeno.	62
Figura 25. Actividad antibacteriana de actinomicetos marinos (n=16) frente a una cepa peruana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 657 (MDR).	62
Figura 26. Cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de sedimentos y su actividad antimicrobiana expresados en % de inhibición frente a indicadores patógenos MDR.	63
Figura 27. Actinomicetos (n = 18) de sedimento marino y su actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram negativos MDR.....	65
Figura 28. Actinomicetos aislados de sedimento marino y su actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram positivos MDR.	66
Figura 29. Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de la esponja <i>Haliclona</i> sp. colectadas en “playa hermosa” (Marcona, Ica). A: cepa MAR16-4E frente a <i>E. coli</i> BLEE+; B: cepa MAR16-4C frente a <i>E. coli</i> BLEE+.	68
Figura 30. Actividad antimicrobiana del actinomiceto MAR16-4C frente a <i>E. coli</i> BLEE+ (A) y <i>S. aureus</i> MR (B).	69
Figura 31. Actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico (D) de la cepa M10-77 frente a <i>S. aureus</i> ATCC 43300. Extractos: A: acetato de etilo; B: n-butanólico; C: Ciprofloxacina (5 µg) (control positivo); E: DMSO (control negativo).....	71
Figura 32. Extracto diclorometánico de <i>Streptomyces</i> M10 – 77 y su actividad antimicrobiana a <i>S. aureus</i> ATCC 43300 (meticilino resistente). Es notorio que a la concentración de 15,625 µg/ml aún mantiene actividad inhibitoria.	71
Figura 33. Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL) del actinomiceto cepa M10-77 por el método microdilución en microplacas.	72
Figura 34. Actividad anti- <i>Candida albicans</i> C 1415 de actinomicetos: M11-125 (A) y M10-77 (B) con 52,5 y 25 mm de diámetro de halos de inhibición respectivamente. ...	73
Figura 35. Actividad anti- <i>Candida albicans</i> cepa 1511 del actinomiceto III 434C. A: actividad en placa; B: actividad del “extracto crudo” (30 µL).....	74
Figura 36. Árbol filogenético de los actinomicetos cepas M10-77 y MC 300, aislados de sedimento marino e identificados como miembros del género <i>Streptomyces</i> en base al análisis de su RNAr 16S. La cepa M10-77, presentó similitud al 99% con <i>Streptomyces erythrogriseus</i> (AB184605).	76
Figura 37. Árbol filogenético de actinomicetos de sedimento marino de la costa central de Perú. El árbol fue elaborado según el método estadístico Neighbor-Joining en base a la relación que existe entre las secuencias del gen RNAr 16S de cepas aisladas de muestras de sedimentos marinos y especies que guardan relación con <i>Streptomyces</i> (barra, 0,02 sustituciones por posición de nucleótido).	78

Figura 38. Árbol filogenético construido según el método de inferencia Neighbor-Joining basado en la relación entre las secuencias del gen RNAr 16S de los actinomicetos (resaltados en negrita) aislados de la esponja <i>Haliclona</i> sp. colectadas en la playa Hermosa – Marcona, Perú y especies relacionadas de <i>Streptomyces</i> . Los números internos corresponden a los valores de soporte de Bootstrap (1000 réplicas). Entre paréntesis son los números de acceso al GenBank. La secuencia de gen RNAr 16S de <i>Bacillus subtilis</i> fue elegida como externa al grupo. (Barra, 0,02 sustituciones por posición de nucleótido).....	80
Figura 39. Microfotografías de actinomicetos aislados de sedimento marino colectados en el litoral central de Perú. A: cepa M11-116A (6000X); B: cepa I 300A (6000X); C: cepa I 434C (6000X); D: cepa BI 662 (12000X); E: cepa B1CD1 (6000X) y F: cepa I 434B (12000X).....	82
Figura 40. Microfotografías de actinomicetos aislados de esponjas marinas del género <i>Haliclona</i> sp. colectadas en playa Hermosa – San Juan de Marcona - Ica. A y B: cepa MAR 12B; C: cepa MAR 16C; D y E: cepa MAR 21 y F: cepa MAR 6B.	83
Figura 41. Cultivo de actinomicetos marinos en presencia y ausencia de agua de mar. Nótese el escaso o nulo crecimiento en el medio preparado con agua desionizada (A1, A2) en comparación con el medio conteniendo agua de mar (B1, B2).....	84
Figura 42. Porcentaje de inhibición de actinomicetos (n=28) a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 cultivados en presencia (AM) y ausencia (AD) de agua de mar.	85
Figura 43. Esponjas marinas, género <i>Haliclona</i> sp. (A). y <i>Hymeniacidon</i> sp. (B).	87
Figura 44. <i>Haliclona</i> sp. A. Especimen fijado. B. Esqueleto ectosomal isodictial. C. Esqueleto coanosomal anisotrópico.....	87
Figura 45. <i>Hymeniacidon</i> sp. A. Espécimen bajo el agua. B. Corte transversal mostrando esqueleto ectosomal y esqueleto coanosomal con haces ascendentes. ...	88

RESUMEN

Actinomicetos de origen marino productoras de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana fueron evaluados por su capacidad inhibitoria contra patógenos multidrogosresistentes (MDR) de origen clínico. Los actinomicetos fueron aislados de sedimento marino (Bahía de Ancón – Lima y Bahía de Independencia – Ica) y de esponjas de orillas intermareales de Pucusana (Lima) y Marcona (Ica). El aislamiento se realizó en Agar Czapeck Dox, Agar Marino y Agar Almidón Caseína. En un tamizaje primario se evaluó la actividad antibacteriana de 62 actinomicetos de sedimento marino; el 50% (31) mostraron actividad inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* 457, 59% (36) a *Pseudomonas aeruginosa* 657 y 37% (23) a ambos patógenos. Cepas seleccionadas del primer tamizaje, fueron evaluadas frente a cepas estándar MDR y otros patógenos Gram negativos, Gram positivos y *Candida albicans*, todos de origen de clínico. Los actinomicetos M10-77; M11-105 y M11-116 mostraron ser excelentes inhibidores de *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 51299 y *E. faecalis* ATCC 29212 respectivamente. Los actinomicetos I-300A, MC-300 y I-300B mostraron mayor actividad inhibitoria frente a *P. aeruginosa* 303 con porcentajes inhibitorios de 72,41; 70,27 y 65,63% respectivamente. Otras cepas relevantes fueron M11-116; I-400 A; MC-300; I-300 C y B1T61, quienes mostraron mayor actividad inhibitoria sobre *Enterococcus* sp. 239, *Staphylococcus epidermidis* 1093, *Staphylococcus coagulasa* negativa y *S. aureus* 1094 con porcentajes inhibitorios de 83,33; 82,86; 79,31; 75,71 y 79% respectivamente. Por su parte, las cepas M11-125 y MC 300 fueron los mejores inhibidores de *Candida albicans*. En una segunda etapa, se logró aislar 37 actinomicetos marinos de las esponjas *Hymeniacidon* y *Haliclona*, que luego fueron evaluadas por su actividad antimicrobiana frente a bacterias uropatógenas drogorresistentes *S. aureus* MR, *Enterococcus* Van R, *E. coli* BLEE+, *E. coli* ampC y *Proteus mirabilis* BLEE+. Las cepas PU9-1, PU8-4, PU17-1, MAR6-5A, MAR16-4C y MAR16-4E mostraron mayor actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* MR. Pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de extractos en diclorometano de la cepa M10-77 presentó actividades inhibitorias de 10,0 y 1,25 µg/mL para *S. aureus* ATCC 43300 y *E. faecalis* ATCC 51299 respectivamente. Según pruebas moleculares de RNAr 16S las cepas de mayor actividad aisladas de sedimentos (B1T6, M11-116, M11-105, MC 300) fueron identificadas como *Streptomyces* sp.; en cambio, I-434B, I-300C y M10-77 corresponden a *Streptomyces variabilis*, *Streptomyces rochei* y *Streptomyces erythrogriseus* respectivamente. Igualmente, las cepas aisladas de esponjas MAR6-5A, MAR6-5B y MAR12-4A fueron identificadas como *Streptomyces pulveraceus*, *Streptomyces aureoversilis* y *Streptomyces globisporus* respectivamente; sin embargo,

una de las más activas, la cepa MAR16 4E fue considerada como *Streptomyces* sp. En conclusión, los actinomicetos aislados de sedimentos de las bahías de Ancón - Lima y de Independencia – Ica y las esponjas colectadas de orillas intermareales de Pucusana y Marcona son fuentes importantes de metabolitos bioactivos con actividad antimicrobiana frente a patógenos MDR.

Palabras clave: Actinobacterias marinas, actividad antimicrobiana, Demospongiae, sedimento marino, patógenos multidrogosresistentes.

ABSTRACT

Actinomycetes of marine origin that produce secondary metabolites with antimicrobial activity were evaluated for their inhibitory capacity against multidrug-resistant (MDR) clinical pathogens. The actinomycetes were isolated from marine sediment (Ancón Bay – Lima and Independencia Bay – Ica) and intertidal sponges samples from Pucusana (Lima) and Marcona (Ica). Isolation was carried out on Czapeck Dox Agar, Marine Agar and Casein Starch Agar. In a primary screening, the antibacterial activity of 62 marine sediment actinomycetes was evaluated; 50% (31) showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* 457, 59% (36) against *Pseudomonas aeruginosa* 657, and 37% (23) against both pathogens. Selected strains from the first screening were evaluated against MDR standard strains and other clinical Gram negative, Gram positive pathogens, and *Candida albicans*. Actinomycetes M10-77; M11-105, and M11-116 proved to be excellent inhibitors of *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 51299, and *E. faecalis* ATCC 29212 respectively. Actinomycetes I-300A, MC-300, and I-300B exhibited higher inhibitory activity against *P. aeruginosa* 303 with inhibitory percentages of 72.41%, 70.27%, and 65.63% respectively. Other relevant strains were M11-116; I-400 A; MC-300; I-300 C, and B1T61, showing greater inhibitory activity against *Enterococcus* sp. 239, *Staphylococcus epidermidis* 1093, coagulase negative *Staphylococcus*, and *S. aureus* 1094, with inhibitory percentages of 83.33%; 82.86%; 79.31%; 75.71% and 79% respectively. Strains M11-125 and MC 300 were the best inhibitors of *Candida albicans*. In a second stage, 37 marine actinomycetes were isolated from *Hymeniacidon* and *Haliclona* sponge, which were then evaluated for their antimicrobial activity against drug-resistant uropathogenic bacteria, including *S. aureus* MR, *Enterococcus* Van R, *E. coli* BLEE+, *E. coli* ampC, and *Proteus mirabilis* BLEE+. Strains PU9-1, PU8-4, PU17-1, MAR6-5A, MAR16-4C and MAR16-4E showed greater antimicrobial activity against *S. aureus* MR. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests of dichloromethane extracts from the M10-77 strain exhibited inhibitory activities of 10.0 and 1.25 µg/mL against *S. aureus* ATCC 43300 and *E. faecalis* ATCC 51299 respectively. According to 16S rRNA molecular tests, strain with the highest activity isolated from sediments (B1T6, M11-116, M11-105, MC 300) were identified as *Streptomyces* sp.; in contrast I-434B, I-300C, and M10-77 correspond to *Streptomyces variabilis*, *Streptomyces rochei*, and *Streptomyces erythrogriseus* respectively. Similarly, strains isolated from sponges MAR6-5A, MAR6-5B and MAR12-4A were identified as *Streptomyces pulveraceus*, *Streptomyces aureoversilis*, and *Streptomyces globisporus* respectively; however, one of the most active strains, MAR16 4E, was considered *Streptomyces* sp. In conclusion, actinomycetes isolated from sediments of Ancón - Lima

and Independencia - Ica bays and sponges collected from intertidal areas of Pucusana and Marcona, are important sources of bioactive metabolites with antimicrobial activity against MDR pathogens.

Keywords: Marine actinobacteria, antimicrobial activity, Demospongiae, marine sediment, multidrug-resistant pathogens.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad a nivel global se han producido cambios notables en la incidencia de enfermedades ya conocidas como malaria, tuberculosis, infecciones respiratorias agudas, enfermedad diarreica aguda, entre otras. Por otro lado, se suma la aparición de nuevas enfermedades causadas por los llamados patógenos emergentes como *Legionella pneumophila*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA), especies nuevas de *Bartonella* (*B. henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*), *Edwardsiella*, *Hafnia*, Rotavirus, Calicivirus, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* micobacterias atípicas, Hantavirus, Lassa virus, Ébola, Virus Sabia, Virus Guanarito, Coronavirus (causante del Síndrome respiratorio agudo severo, SRAS), HTLV1, VIH/SIDA, diversas variedades del virus influenza, entre otros (Mukherjee, 2017; Gonzáles *et al.*, 2019).

Se estima que, en el mundo, cerca de 700,000 personas mueren anualmente debido a infecciones por patógenos drogorresistentes, y se calcula que para el año 2050 si el problema continúa podrían morir 10 millones de personas anualmente (Foxlee *et al.*, 2019). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los patógenos multirresistentes se clasifican en diferentes prioridades, que van desde la 1 hasta la 3 (Tacconelli *et al.*, 2018). Si bien, la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, la mala práctica como el uso indiscriminado, excesivo o insuficiente de los agentes antibióticos continúan permitiendo que microorganismos multirresistentes se adapten mediante sofisticados mecanismos de defensa (Khan & Khan, 2016); hecho que agrava dramáticamente el tratamiento de bacterias patógenas drogorresistentes a los antibióticos actualmente disponibles (Bérdy, 2012).

Más del 70 % de los patógenos bacterianos son resistentes al menos a un tratamiento antibiótico actual; por lo tanto, la necesidad de nuevos antibióticos para combatir la resistencia es cada vez más urgente (Sharma *et al.*, 2018). Las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos, especialmente las causadas por los patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*), son las mayores amenazas en medicina (Wright, 2012). Por otro lado, las bacterias Gramnegativas MDR plantean problemas importantes para el desarrollo de nuevos antibióticos debido a los mecanismos de resistencia que no son específicos de clases particulares de antibióticos (Lewis, 2020)

El filo Actinobacteria constituye un grupo de bacterias Grampositivas con diversas características fisiológicas y morfológicas, que suelen compartir un alto contenido genómico de guanina+citosina (Chen *et al.*, 2016). En general, las actinobacterias son muy fructíferas en la producción de compuestos bioactivos de alto interés farmacéutico e industrial, siendo responsables de la producción de alrededor de 40% (aprox. 13.700) de todos los metabolitos microbianos bioactivos conocidos. Entre las actinobacterias destaca *Streptomyces*, cuyas especies son responsables de la producción de cerca del 76% de los compuestos bioactivos o metabolitos microbianos derivados de actinobacterias (Manivasagan *et al.*, 2013).

En los años recientes, ha sido de gran interés los microorganismos marinos no solo por su diversidad taxonómica e importancia ecológica, sino también por su potencial capacidad de producir nuevos productos naturales, entre ellos compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica (Jagannathan *et al.*, 2021). Los océanos son el lugar perfecto de una gran diversidad de microorganismos, aunque la gran mayoría de los ecosistemas marinos aún están inexplorados en diversidad de actinobacterias y, por lo tanto, de nuevos metabolitos (Manivasagan *et al.*, 2014). Es así como el ambiente marino desde hace varias décadas representa un enorme potencial en la búsqueda de nuevas pistas terapéuticas para el desarrollo de nuevos antibióticos y enfrentar las amenazas actuales de la multirresistencia bacteriana (Schinke *et al.*, 2017).

Los actinomicetos marinos aislados de sedimentos oceánicos producen antibióticos que son activos contra bacterias multirresistentes (MDR), entre ellas bacterias Gram negativas como las Enterobacterias resistentes a carbapenem (CRE), y Gram positivas como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a la vancomicina (VRE) (Norouzi *et al.*, 2018; Igarashi *et al.*, 2021).

Los ecosistemas marinos del Océano Pacífico han sido muy poco explorados y esto incluye el litoral central del territorio marítimo de Perú cuya población de actinobacterias está escasamente estudiada. Dichos entornos ofrecen una excelente oportunidad para acceder a nuevos miembros actinobacterianos, aumentando así las perspectivas de encontrar nuevos compuestos naturales con bioactividad (León *et al.*, 2016).

En este estudio, se utilizó muestras de sedimento y esponjas marinas recolectadas en la zona litoral de las bahías de Independencia (Ica), Ancón (Lima), Pucusana (Lima) y Marcona (Ica); todas comprendidas en la región central del litoral peruano (11°46'12''S; 77°15'35''W – 15°21'20''S; 75°10'17''W), para investigar actinobacterias cultivables con potencial antimicrobiano.

II. ANTECEDENTES

2.1. Ecosistema marino y actinobacterias

El ecosistema marino alberga una amplia diversidad de flora, fauna y microbiota nativa de gran valor benéfico para la humanidad (Berdy, 2005), y está considerado como el mayor reservorio natural de nuevos compuestos y moléculas con actividad biológica (Venter *et al.*, 2004). Los océanos son una gran fuente de diversos organismos, muchos de ellos aún desconocidos, considerado de esta manera en uno de los entornos más megadiversos de nuestro planeta (Armbrust & Palumbi, 2015; Tully *et al.*, 2018).

Las Actinobacterias ocupan un lugar preferencial en la naturaleza debido a su compleja diversidad y capacidad comprobada para producir diversos compuestos bioactivos. Del total de metabolitos secundarios originarios de bacterias, aproximadamente el 70 % lo producen el Phylum Actinobacterias del *Orden Actinomycetales*, 20 % hongos, 7 % *Bacillus* spp. y entre 1 a 2% otras bacterias (Subramani & Aalbersberg, 2012).

Las Actinobacterias han sido consideradas y reconocidas como los principales organismos saprofitos, muy prolíficos y productores de diversos metabolitos que contribuyen significativamente en el ciclo de la materia orgánica del suelo (Williams *et al.*, 1984); sin embargo, las investigaciones realizadas en ecosistemas marinos durante las últimas décadas ha permitido cambiar este concepto de manera sustancial, considerándose hoy en día a las actinobacterias como miembros nativos alternos de hábitat marino; siendo además, fuentes virtualmente ilimitadas de nuevas sustancias con múltiples aplicaciones en el futuro (Mincer *et al.*, 2002).

Entre los miembros del Phylum Actinobacteria resalta el género *Streptomyces*, cuyo descubrimiento ocurrió por primera vez en 1943; sin embargo, a la fecha más de 800 *Streptomyces* spp. fueron registrados y publicados como productores de compuestos naturales con actividad antimicrobiana, siendo la mayoría de origen terrestre (Parte *et al.*, 2020). El descubrimiento de nuevos metabolitos bioactivos producidos por *Streptomyces* de nuevas fuentes ha redirigido a los científicos a la exploración de ecosistemas marinos en la búsqueda de nuevos antibióticos (Subramani *et al.*, 2019).

El término "Streptomycetes" se utiliza para referirse a los microorganismos del suelo y marinos clasificados como *Streptomyces* spp. del filo *Actinobacteria* en el orden *Actinomycetales* y familia *Streptomycetaceae* (Parte *et al.*, 2020). Los estreptomicetos son ubicuos en ambientes terrestres y marinos con mayor diversidad en hábitats terrestres (Quinn *et al.*, 2020). Al margen de su hábitat, los productos bioactivos de los Streptomycetes exhiben una gran diversidad estructural y actividad biológica muy

significativa (Donald *et al.*, 2022). Las técnicas para el aislamiento en el laboratorio son conocidas y facilitan obtener cepas valiosas de interés biotecnológico. Sin duda, el género *Streptomyces* produce la mayor cantidad de productos naturales en comparación con otros géneros de Actinobacteria (Parte *et al.*, 2020).

Los ecosistemas marinos, en especial los sedimentos e invertebrados han sido considerados muestras ideales para la búsqueda de nuevas actinobacterias bioactivas, a la vez ellos son productores significativos de antibióticos naturales y fuentes inagotables de otros metabolitos secundarios (Bull *et al.*, 2000).

En el mundo contemporáneo hay un incremento de la frecuencia en aparición de nuevas enfermedades infecciosas, además de los clásicos cuadros ya declarados como emergentes y reemergentes (Rebollo *et al.*, 2021). Por otro lado, la presencia cada vez mayor de patógenos humanos resistentes a múltiples fármacos en centros hospitalarios y su diseminación ambiental se van convirtiendo en una amenaza significativa para la salud global (Bisso, 2018). Este panorama obliga a los científicos dirigir sus estudios e investigaciones a la búsqueda urgente de nuevos antibióticos para combatir las infecciones microbianas (Terreni *et al.*, 2021).

A pesar, que actualmente se cuenta con el uso de grandes genotecas para desarrollar nuevos fármacos, los productos naturales en particular los metabolitos secundarios de origen microbiano, sigue siendo una fuente predominante de bioactivos que son fundamentales para la creación de nuevos antibióticos (Challinor & Bode, 2015).

Muchos antimicrobianos de uso clínico convencional son en la actualidad metabolitos secundarios de actinomicetos o sus derivados semisintéticos (Manivasagan *et al.*, 2014). Por otro lado, la resistencia de los patógenos a los antimicrobianos es cada vez mayor, y va en aumento a niveles peligrosamente altos en todo el mundo, amenazando la capacidad para tratar enfermedades infecciosas. La resistencia antimicrobiana se acelera por lo general por el mal uso o exceso de antibióticos, así como por la mala prevención y control de enfermedades infecciones (WHO, 2017).

Desde hace décadas, los científicos han prestado atención al entorno del mar, ya que representa un enorme potencial para la búsqueda de nuevas pistas terapéuticas en el desarrollo de nuevos antibióticos para enfrentar las amenazas actuales de la multirresistencia bacteriana (Schinke *et al.*, 2017). En consecuencia, las actinobacterias marinas han sido consideradas como una gran fuente de productos naturales con diferentes propiedades biológicas, incluidas las actividades antimicrobianas, anticancerígenas, antivirales, insecticidas e inhibidoras de enzimas (Manivasagan *et al.*, 2014).

El género *Streptomyces* es el productor más prolífico de las actinobacterias, siendo responsables de la producción del 74 % de compuestos naturales, mientras que los no *Streptomyces* o actinomicetos raros representan el 26 %; por ello, son considerados como las actinobacterias con mayor potencial de producir compuestos diversos, únicos, sin precedentes y estructuralmente complicados con una excelente potencia antibacteriana y de baja toxicidad (Berdy, 2005). Es sorprendente la capacidad de nuevas actinobacterias marinas para producir productos con potencial actividad antibiótica capaces de controlar las enfermedades emergentes (Rangseekaew & Pathom-aree, 2019) y/o patógenos resistentes a antibióticos (Ahmed *et al.*, 2020).

Los nuevos antibióticos de actinobacterias marinas comúnmente incluyen metabolitos como el anticáncer salinosporamide A de *Salinospora* (Fehling *et al.*, 2003), o de estructuras únicas como marinomycine de *Marinophilus* (Jensen *et al.*, 2005a), abyssomycine C un potente inhibidor de la vía de ácido para-aminobenzoico de *Verrucosispora* (Riedlinger *et al.*, 2004) y marinopirroles de cepas de *Streptomyces* (Hughes *et al.*, 2008). Aún es muy poco el conocimiento acerca del potencial antimicrobiano de actinobacterias de hábitat marino que guarda ingentes recursos naturales de importancia en biotecnología microbiana (De La Hoz-Romo *et al.*, 2022).

A la fecha, existen numerosas publicaciones en el mundo sobre estudios de Actinobacterias marinas de los géneros clásicos y nuevas especies aisladas de diversos ecosistemas tales como zonas intermareales (Goodfellow & Williams, 1983), sedimentos marinos y estuarinos (Jensen *et al.*, 2005a; Bull *et al.*, 2005; Thornburg *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011), columnas de mar (Ramesh & Mathivanan, 2009), en simbiosis con invertebrados, por ejemplo esponjas (Piel, 2004; Kim *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010), animales (Maldonado *et al.*, 2005) y plantas (Castillo *et al.*, 2005).

El Perú tiene el privilegio de contar con una inmensa franja costera reconocida a nivel mundial por su riqueza en la flora y fauna marina; sin embargo, es muy poca la información que se tiene acerca de la diversidad del microbiota de estos ecosistemas. Por otro lado, la aparición de nuevas patologías en la sociedad actual, la aparición cada vez mayor de formas multidrogorresistentes de patógenos humanos invitan a la comunidad científica a explorar ecosistemas marinos en la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos como alternativas para afrontar los problemas de salud pública y veterinaria.

2.2. Phylum Actinobacterias (hoy Phylum Actinomycetota)

La primera descripción sobre el Orden Actinomycetales y Familia Actinomycetaceae corresponde a Buchanan (1917 y 1918 respectivamente). Posteriormente Stackebrandt *et al.* (1997) propusieron una nueva Clase llamada Actinobacteria bajo el Dominio Bacteria, seguida del Phylum con el mismo nombre. Recientemente Salam *et al.* (2020) propusieron una nueva clase llamada Actinomycetia; sin embargo, el nombre del Phylum Actinobacteria se revisó y pasó a denominarse a Actinomycetota (Oren & Garrity, 2021). En resumen, el Phylum Actinomycetota es el antiguo Phylum Actinobacteria; la Clase propuesta Actinomycetia es la antigua clase Actinobacteria. La clase Actinomycetia también incluye a los miembros del antiguo orden Actinomycetales, que es diferente al actual orden Actinomycetales. Finalmente, todos los miembros de la clase Actinomycetia son actinomicetos (actinomycetes en plural), un término general que ha estado en uso durante más de 70 años (Kurtböke, 2022).

Las Actinobacterias (o Actiobacterias), tradicionalmente más conocidas como Actinomicetos, son bacterias que en su mayoría viven en los suelos. Representan a una de las formas típicas de la Tierra y desempeñan un papel crucial en la descomposición de la materia orgánica y el reciclaje de nutrientes en múltiples ecosistemas (Battistuzzi & Hedges, 2008).

El Phylum Actinobacteria es una de las unidades taxonómicas más grandes dentro del Dominio Bacteria (Ludwing *et al.*, 2012). La heterogeneidad de sus genomas refleja su biodiversidad múltiple perteneciente a organismos relevantes para la medicina humana y veterinaria, la biotecnología y la ecología (Ventura *et al.*, 2007); siendo la mayoría ser microorganismos de vida libre que se encuentran principalmente en ecosistemas terrestres y acuáticos (incluidos los marinos) (Macagnan *et al.*, 2006).

Las actinobacterias son bacterias Grampositivas con un contenido G + C alto en su ADN comprendido entre 57 al 75 % (Bahrami *et al.*, 2022). Constituyen uno de los filos bacterianos más grandes de distribución ubicua. En su ciclo vital experimentan una diferenciación morfológica compleja pasando por un estado micelial vegetativo y otro esporular (Barka *et al.*, 2016). Asimismo, cuentan con un metabolismo secundario complejo, siendo responsables de la producción de muchos compuestos bioactivos con actividad biológica múltiple, así como de al menos dos tercios de los antibióticos de origen natural actualmente utilizados en el mercado mundial (Hopwood, 2000).

Las actinobacterias son en su mayoría aeróbicas, aunque algunos géneros pueden ser microaerófilos e inclusive anaerobios (Ventura *et al.*, 2007). Metabólicamente son

heterótrofos o quimioautotróficos, aunque la mayoría optan ser quimioheterotróficos y pueden utilizar una amplia gama de fuentes nutricionales, como una variedad de polisacáridos (Goodfellow & Williams, 1983; Stach & Bull, 2005). Además, exhiben características metabólicas importantes, como la producción de moléculas con propiedades bioactivas relevantes, enzimas extracelulares y varios tipos de pigmentos (Schrempf, 2001).

Las actinobacterias juegan diversos roles en la naturaleza, resaltando sobre todo sus asociaciones con otros organismos de mayor complejidad, ya que sus miembros han adoptado diferentes estilos de vida, incluyendo formas patógenas como ocurre con ciertas especies de los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* y *Tropheryma*; o son habitantes saprófitos del suelo como ciertas especies de *Micromonospora* y *Streptomyces*; comensales o endófitos de plantas como *Frankia* spp y comensales gastrointestinales como *Bifidobacterium* spp. Asimismo, las actinobacterias juegan un rol muy importante como simbioses y patógenos entre las comunidades microbianas cuando se asocian a ciertos animales y plantas (Seipke *et al.*, 2012; Barka *et al.*, 2016).

Las actinobacterias en general se reproducen por fisión binaria; sin embargo, los miceliales comúnmente conocidos como estreptomycetos se propagan mediante esporas o conidias, siendo estas estructuras reproductivas externas (exoesporas) elementos de forma bacilar o cocoide. Por lo general producen dos formas de micelios ramificados conocidos como micelio del sustrato y micelio aéreo (Siva, 2001). Asimismo, los actinomicetos se describen como bacterias mesófilas por su buen crecimiento en el laboratorio a temperaturas entre 30 a 35 °C (Sathiyaseelan & Stella, 2011).

Los actinomicetos (término utilizado tradicionalmente) son ampliamente reconocidos como microorganismos saprófitos, aeróbicos y heterótrofos (Williams *et al.*, 1989). Su viabilidad en una amplia gama de ecosistemas se debe a su capacidad de formar exoesporas que les permite mantenerse en estado de dormancia por largos periodos de tiempo (Zaitlin & Watson, 2006). Su hábitat común son los suelos, por lo que se les conoce históricamente como uno de los microorganismos terrestres más prolíficos y representativos (Mayfield, 1972); aunque, en la actualidad se ha descrito nuevos géneros que comprenden cientos de especies de origen eminentemente marinos (Barka *et al.*, 2016).

Son ampliamente conocidos por la producción de compuestos bioactivos; por ello, se resalta la importancia biotecnológica en el área industrial, principalmente farmacológica

(Tamehiro *et al.*, 2003; Higginbotham & Murphy, 2010). Sin embargo, en los últimos años se han descrito otras características fisiológicas sumamente importantes, tales como la capacidad biorremediante de ecosistemas impactados, protección del medio ambiente, fijación del nitrógeno, mineralización de la materia orgánica, inmovilización de los nutrientes minerales; así como también producción de importantes compuestos de interés agrícola o promotores de crecimiento vegetal (Selim *et al.*, 2021).

Los actinomicetos representan una fuente de metabolitos secundarios biológicamente activos como antibióticos, agentes biopesticidas, hormonas de crecimiento vegetal, compuestos antitumorales, agentes antivirales, compuestos farmacológicos, pigmentos, enzimas, inhibidores de enzimas, compuestos antiinflamatorios, proteínas unicelulares y biosurfactantes (Selim *et al.*, 2021). Los actinomicetos también son esenciales en la producción de nuevos compuestos que actúan como enzimas, agentes antioxidantes, inhibidores de enzimas, inmunomoduladores, antiparasitarios, herbicidas, pesticidas y vitaminas (Butler, 2004; Atta, 2007; Arbat & Zodpe, 2014; Rashad *et al.*, 2015). Adicionalmente, se resalta las actividades que cumplen los actinomicetos en el metabolismo de compuestos orgánicos a través de sus enzimas extracelulares como quitinasas, ligninasas, xilanasas y pectinasas (Arbat & Zodpe, 2014).

2.3. Taxonomía e identificación de las Actinobacterias

La caracterización de los microorganismos a escala macroscópica y microscópica es la base principal del estudio convencional de las actinobacterias; también de pruebas fisiológicas y bioquímicas complementarias; sin embargo, en los últimos años el estudio ha abarcado a nivel molecular en especial en la identificación filogenética (Duraipandiyar *et al.*, 2010).

En la actualidad, en la búsqueda de caracterizar estos microorganismos e identificar el género o hasta la especie, se requiere el uso de herramientas más complejas como la microscopia electrónica para determinar cada una de las estructuras morfológicas, también varios estudios fisiológicos, la determinación del tipo de peptidoglicano, realizar pruebas de correlación de la composición de la pared celular y el análisis molecular de la relación y contenido de G-C en el ADN (Franco-Correa, 2009). Los métodos moleculares han mejorado la clasificación bacteriana y una variedad de métodos de clasificación han surgido debido a la gran variedad de la familia Actinomycetaceae, especialmente el género *Streptomyces*, que difiere mucho en su morfología, bioquímica, fisiología y actividades como productores de antibióticos (Franco-Correa, 2009).

Entre los 18 linajes principales reconocidos actualmente en el dominio Bacteria, las actinobacterias son una de las unidades taxonómicas más grandes. Los géneros de este filo exhiben amplitud en su diversidad morfológica, fisiológica y capacidades metabólicas (Ventura *et al.*, 2007).

La taxonomía de Actinobacterias ha evolucionado con el correr del tiempo y la consecuente acumulación de nuevos conocimientos. El Phylum Actinobacteria se delinea sobre la base de su posición filogenética de sus genes RNAr 16S; sin embargo, las secuencias no discriminan de todo entre géneros aún muy estrechamente relacionados e incluso entre especies (Girard *et al.*, 2014).

Entre las Actinobacterias, sobresale el Orden Micrococcales por contener numerosas familias y géneros descritos; sin embargo, el Orden Streptomycetales que contiene a su vez a la Familia Streptomycetaceae y el Género *Streptomyces*, resulta siendo la Actinobacteria de mayor importancia biológica por ser responsable de la producción de numerosos compuestos bioactivos (Mast & Stegmann, 2019).

En muchas publicaciones el término actinobacteria se utiliza como sinónimo de la clase Actinobacteria. La diversidad de géneros y especies de actinobacterias muy reconocidos que incluye patógenos serios como *Corynebacterim*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* y *Thropherma* spp.; habitantes de suelos o acuáticos *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Salinispora* y *Streptomyces* spp.; patógenos de plantas como *Leifsonia* spp.; simbiontes de plantas o fijadoras de nitrógeno como *Frankia* spp. y habitantes del tracto gastrointestinal, por ejemplo, *Bifidobacterium* spp. (Ventura *et al.*, 2007; Barka *et al.*, 2016).

Las actinobacterias presentan una gran diversidad morfológica, que van desde formas cocoide (*Micrococcus* spp.), cocobacilos (p. ej., *Arthrobacter* spp.) hasta formas filamentosas (p. ej. *Streptomyces*); pero también contemplan especies en las que se produce fragmentación de hifas (p. ej., *Nocardia* spp.) o que se diferencian en micelio ramificado (p. ej. *Streptomyces* spp.) (Ventura *et al.*, 2007; Barka *et al.*, 2016).

Una forma única de reproducción vegetativa es la fragmentación micelial; las actinobacterias miceliales se reproducen mediante esporas asexuales. Otras actinobacterias se reproducen mediante esporas, esporangiosporas o conidióforos, siendo éstas la principal forma de reproducción a gran escala. Cada espora germina y crece para que se desarrolle un nuevo microorganismo (Figura 1) (Ngamcharungchit *et al.*, 2023) y Figura 2 (Barka *et al.*, 2016).

La resistencia al calor de las esporas es intermedia, pero las esporangiosporas y los conidióforos son resistentes a la deshidratación y ayudan a la supervivencia de las especies en condiciones adversas. Otras especies, como el género *Nocardia*, se multiplican por fragmentación de hifas en varias células baciliformes o cocos, cada una con capacidad de producir un micelio (Ventura *et al.*, 2007).

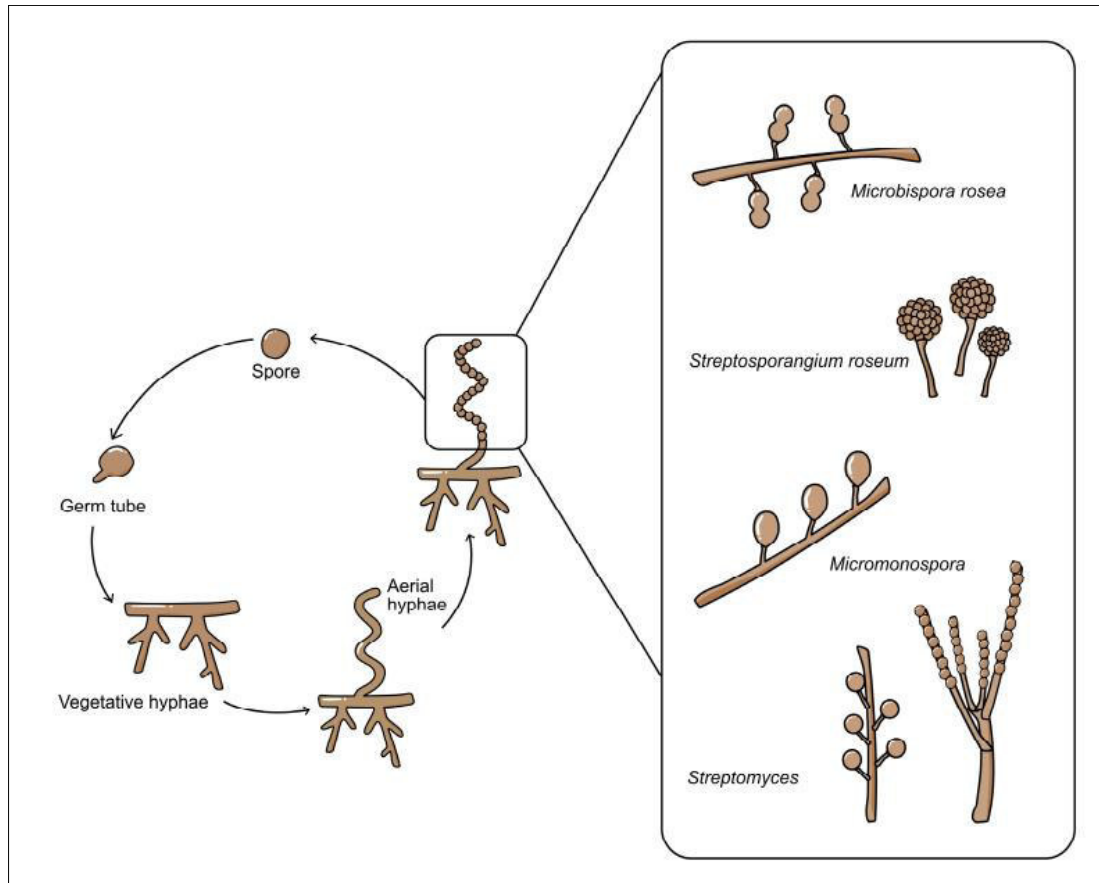


Figura 1. Ciclo de vida de actinomicetos, desde conidiosporas hasta esporulación. Los distintos tipos de conidiosporas se muestran en el cuadro ampliado (Fuente: Ngamcharungchit *et al.*, 2023).

La morfología microscópica y la quimiotaxonomía son las principales características convencionales utilizadas para delinear la taxonomía de las actinobacterias en género y especie, siendo la quimiotaxonomía el parámetro que relaciona la estructura de la pared celular y la distribución de azúcares en la célula; aunque la composición de fosfolípidos y el tipo de menaquinona también se pueden considerar con fines de ajuste fino (Labeda, 1987).

Las actinobacterias exhiben amplia variedad de morfologías, diferenciándose principalmente con respecto a la presencia o ausencia de un sustrato micelio o micelio

aéreo, el color del micelio, la producción de pigmentos melanoides difusibles y la estructura y apariencia de sus esporas. Con algunas excepciones (p. ej. *Sporichthya* sp.), las actinobacterias forman un micelio de sustrato tanto en cultivos sumergidos como sólidos; sin embargo, en superficies sólidas, muchas se diferencian para formar hifas aéreas para producir esporas reproductivas (Flårdh & Buttner, 2009; Van *et al.*, 2014). El micelio de sustrato es el producto de una spora en germinación y es por lo general monopodial, aunque algunas como *Thermoactinomyces* exhiben ramificación dicotómica (Kalakoutskii & Agre, 1976).

Por otro lado, la familia *Micromonosporaceae* produce un extenso micelio de sustrato, pero micelio aéreo ausente o rudimentario. Los rodococos forman filamentos alargados o pseudomicelios sobre el sustrato, mientras que las corinebacterias no producen micelio en absoluto (Locci & Schaal, 1980). El género *Oerskovia* se caracterizan por formar hifas de sustrato ramificadas que se descomponen en elementos móviles flagelados (Prauser *et al.*, 1970). Finalmente, las micobacterias no suelen formar hifas aéreas, aunque existen algunas excepciones (Ochi, 1995).

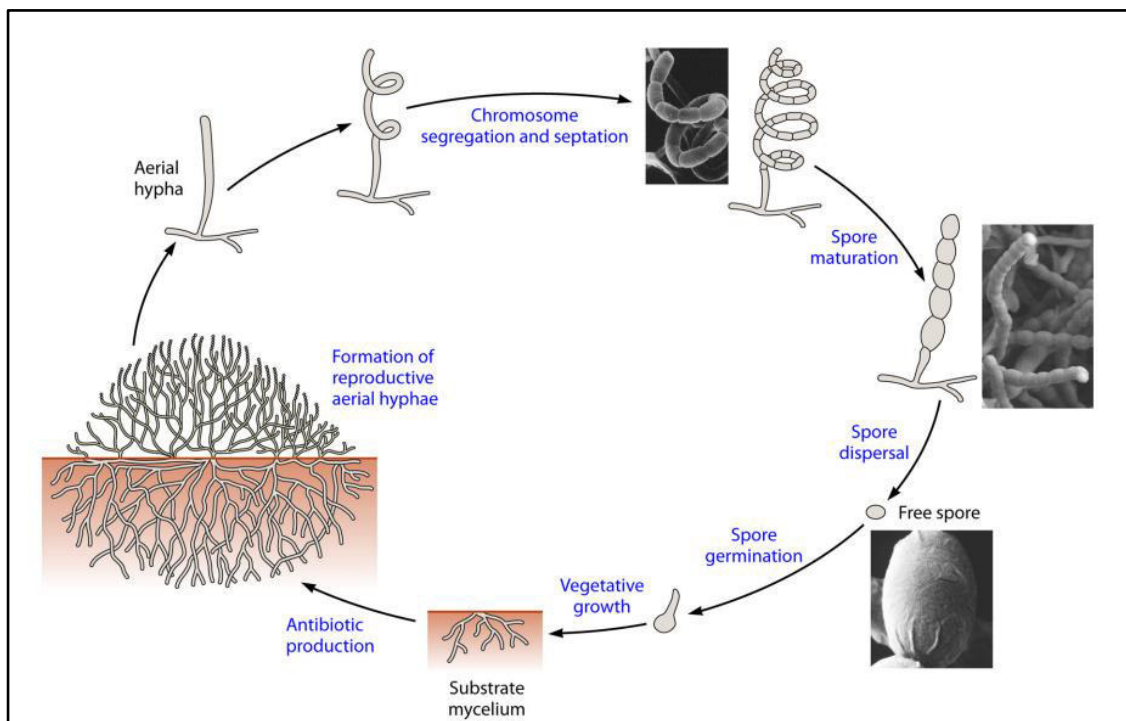


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de los actinomicetos (Fuente: Barka *et al.*, 2016).

Otro aspecto relevante en la taxonomía convencional de las actinobacterias es la morfología y disposición de sus esporas (Figura 3). Las esporas pueden formarse en el micelio del sustrato y/o aéreo como células individuales o formando cadenas de

diferentes longitudes. En otras situaciones, pueden alojarse en esporangios o vesículas especiales y ocasionalmente pueden tener flagelos. La formación de esporas de *Micromonospora*, *Micropolyspora* y *Thermoactinomyces* se produce directamente sobre el micelio de sustrato, mientras que las esporas de *Streptomyces* se forman a partir del micelio aéreo. Las esporas de *Actinoplanes* y *Actinosynnema* son móviles, en cambio la endospora de *Thermoactinomyces* es resistente al calor (Cross & Goodfellow, 1973).

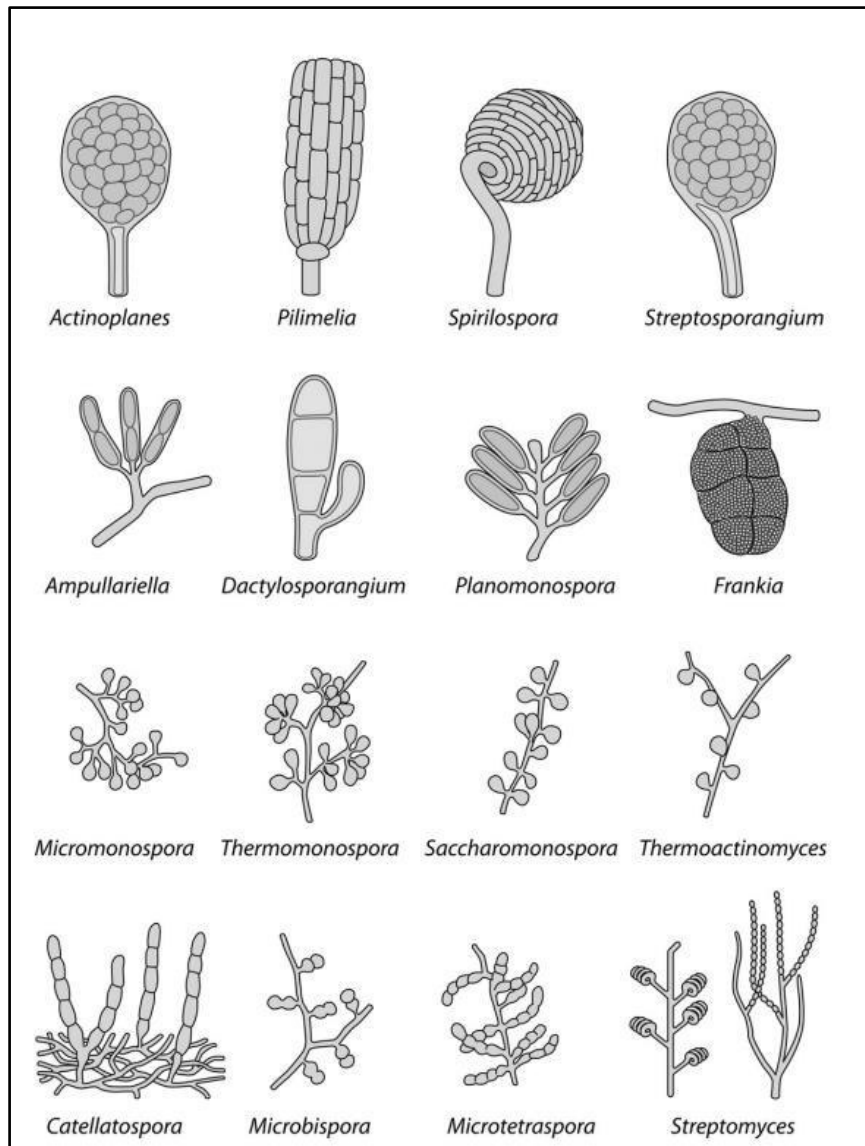


Figura 3. Dibujos de varios tipos de esporas producidas por actinomicetos (Fuente: Barka *et al.*, 2016).

Otras actinobacterias tienen esclerocios (*Chainia*), sinemas (*Actinosynnema*), vesículas con esporas (*Frankia*) o vesículas sin esporas (*Intrasporangium*). Finalmente, las esporas pueden tener superficies lisas, rugosas, peludas, verrugosas o espinosas,

morfologías que pueden ser útiles en la caracterización de géneros (Dietz & Mathews, 1971).

El número de esporas por micelio varía de un género a otro. *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* y *Promicromonospora* producen esporas aisladas; en cambio, *Microbispora* produce esporas en pares longitudinales. *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporicthya* y algunas *Nocardia* spp. tienen cadenas de esporas cortas, mientras que *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* y ciertas *Nocardia* spp. producen cadenas largas de hasta 100 esporas. *Frankia* produce esporangios o paquetes de esporas. La cadena de esporas de *Streptomyces* puede ser: rectas o flexuosas, bucles abiertos, espirales abiertas o cerradas o verticiladas (Pridham *et al.*, 1958)

Un aspecto que se toma en cuenta en el estudio taxonómico de actinomicetos es la producción de pigmentos melanoides. Son polímeros que tienen diversas estructuras moleculares de color negro o marrón que se forman por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos e indólicos. Ciertas actinobacterias producen estos pigmentos, que pueden ser rojos, amarillos, anaranjados, rosados, parduscos, marrones distintos, marrones verdosos, azules o negros (Lechevalier & Lechevalier, 1965). Aunque los melanoides no son necesarios para el crecimiento y desarrollo de los organismos, son esenciales para su supervivencia y competitividad (Dastager *et al.*, 2006).

2.4. Clasificación Molecular de Actinobacterias

Con el advenimiento de la biología molecular la clasificación morfológica y química tradicional de las actinobacterias ha sufrido grandes modificaciones. El estudio genómico de los últimos años ha permitido que algunas actinobacterias que se encontraban erróneamente en ciertos grupos taxonómicos se hayan reclasificado sobre la base de sus análisis moleculares (Barka *et al.*, 2016). Un ejemplo reciente es la definición final de *Kitasatospora* como un género separado dentro de *Streptomycetaceae* (Girard *et al.*, 2013). La secuenciación del genoma resolvió un debate de larga data sobre la relación de este grupo con el género *Streptomyces* y demostró de manera concluyente que, de hecho, es un género separado (Girard *et al.*, 2014).

La taxonomía actualizada del Phylum Actinobacteria incluye seis Clases (Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitrospirae, Rubrobacteriia y Thermoleophilia), 29 órdenes, 67 familias, 391 géneros y 3900 especies. De ellos, el 90 % están dominados por la clase Actinobacteria, luego el 4,6 % por Coriobacteriia y 0,5 % por la clase

Rubrobacteria. El género *Streptomyces* es el más común y dominante, incluyendo 961 especies (Barka *et al.*, 2015).

La Clase *Actinobacteria* comprende a su vez 15 órdenes: Actinomycetales, Actinopolysporales, Bifidobacteriales, Catenulisporales, Corynebacteriales, Frankiales, Glycomycetales, Jiangellales, Kineosporiales, Micromonosporales, Micrococcales, Propionibacteriales, Pseudonocardiales Streptosporangiales y Streptomycetales. Cada una de estas órdenes están conformadas por familias y éstos a su vez por géneros, todos ellos comúnmente conocidos como actinomicetos o actinobacterias (Ludwig *et al.*, 2015). En la actualidad, no se puede reivindicar una nueva especie sin un análisis genético basado en la secuenciación del gen RNAr 16S y la hibridación del DNA-DNA, e incluso la secuenciación del genoma ya forma parte de la actividad rutinaria. Es así, se siguen descubriendo taxones nuevos, por lo que la lista nunca será completa (Sharma *et al.*, 2019).

Por otro lado, se ha utilizado criterios de composición molecular y química para agrupar el Orden Actinomycetales en 14 subórdenes: Actinomycineae, Actinopolysporineae, Corynebacterineae, Catenulisporineae, Frankineae, Glycomycineae, Jiangellineae, Kineosporineae, Micrococccineae, Micromonosporineae, Pseudonocardineae, Propionibacterineae, Streptosporangineae y Streptomicineae (Euzéby 1997). Además, la secuenciación de los genes RNAr 16S ha llevado al reconocimiento de 39 familias y 130 géneros (Figura 4).

Todos los grupos previamente asignados al rango taxonómico de "orden" se recuperaron como estrictamente monofiléticos según estos criterios moleculares y químicos, pero algunos grupos parafiléticos se encontraron dentro del rango "suborden". Esto podría deberse a que la clasificación se basó principalmente en árboles de genes RNAr 16S, que se generaron sin soporte de arranque y, por lo tanto, pueden incluir resultados engañosos (Barka *et al.*, 2016).

Entre los miembros del Orden Actinomycetales destacan algunos géneros, ya sea por su importancia industrial o ser agentes causales de alguna patología en humanos, plantas o animales. Estos son: *Tropheryma*, *Micromonospora*, *Propionibacterium*, *Salinispora*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Leifsonia*, *Streptomyces*, *Frankia* y *Thermobifida* (Barka *et al.*, 2016).

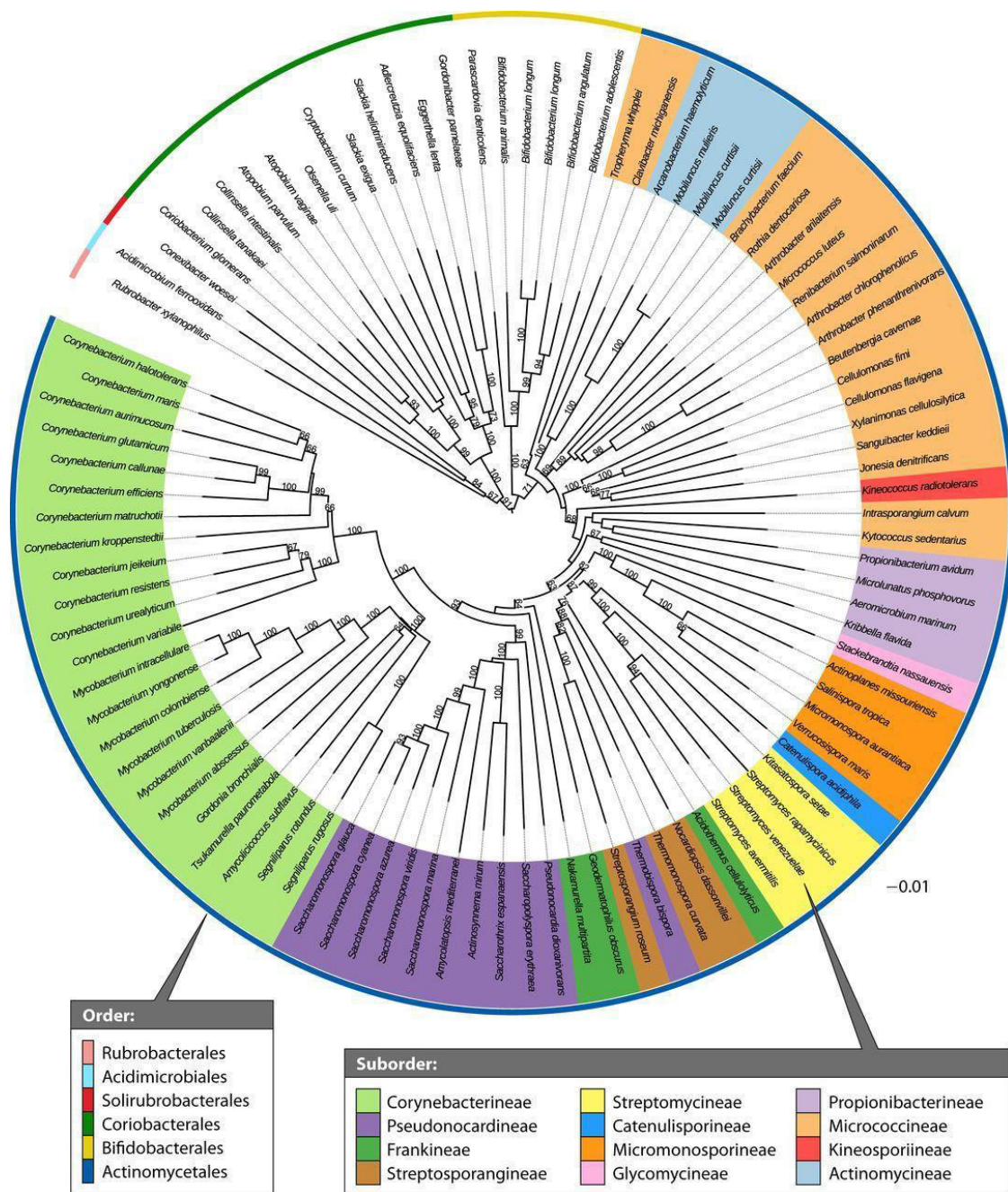


Figura 4. Árbol filogenético basado en la secuenciación de los genes RNAr 16S del Orden Actinomycetales (Fuente: Barka *et al.*, 2016).

2.5. Actinobacterias y su distribución

Las actinobacterias o actinomicetos están ampliamente distribuidos en todo tipo de hábitats, tales como suelos, asociados a plantas como rizosfera, actinomicorrizas, endófitos, suelo hipersalino, piedra caliza, agua dulce, agua de mar, esponjas, cuevas

volcánicas, desiertos, el aire, intestinos de los insectos, excrementos de lombrices, heces de cabra, en fin, en múltiples ecosistemas naturales (Selim *et al.*, 2021).

Las actinobacterias se han adaptado a todo tipo de ecosistemas, en consecuencia, están presentes tanto en ambientes terrestres como acuáticos (agua dulce y salada), así como en el aire; sin embargo, son más predominantes en suelos, lugar de donde fueron aislados originalmente, donde tienen una contribución importante principalmente en la descomposición de la materia orgánica (Ventura *et al.*, 2007). Son tan versátiles que se han adaptado a todo tipo de ecosistemas y condiciones ambientales; sin embargo, se considera que solo el 10% se ha aislado para su estudio (Kumar *et al.*, 2010). Asimismo, son tan diversas y ampliamente distribuidas que constituye alrededor del 10 al 50 % de la población microbiana total del suelo (Barka *et al.*, 2016).

En la rizosfera están presentes varios grupos de actinobacterias estables, cuya importancia radica en la producción de compuestos bioactivos, entre ellos los antimicrobianos, cuya función estaría vinculada con la protección de las plantas al detener la propagación de patógenos. De la misma forma, debido a su diversidad metabólica, las actinobacterias se consideran una buena fuente de enzimas líticas, antibióticos y otros metabolitos bioactivos que forman parte de compuestos que promueven el crecimiento vegetal (González-Franco *et al.*, 2009). Por otro lado, otras actinobacterias como el género *Frankia* spp. forman parte del microbiota actinomicorrízica al establecer nódulos para la fijación del nitrógeno (Daniel *et al.*, 2011).

Los ecosistemas extremófilos como suelos y lagos hipersalinos que contienen de 9 a 23 % de sales, son también fuentes ideales para el aislamiento de ciertas actinobacterias como *Streptomyces alboflavus*, *Micromonospora* sp., *Nocardia* sp. y *Streptomyces griseoflavus* con actividad antibacteriana y antifúngica (Karuppiyah & Mustaffa, 2013; Ballav *et al.*, 2015).

2.5.1. Actinobacterias en ecosistemas marinos

El ambiente marino va desde la superficie del mar hasta la zona pelágica, comenzando de la zona de las mareas hasta alta mar (mar abierto), logrando alcanzar profundidades mayores a 10 mil metros (Ward & Bora, 2006). El fondo marino está constituido por sedimentos de diversa geología y una micro y macrofauna con diversas relaciones bióticas, simbiosis y epibiosis (Ward & Bora, 2006).

Más del 70 % de la superficie terrestre está cubierta por el océano y representa el entorno menos explorado para investigar la variedad microbiana. Se trata de

ecosistemas con características únicas en presión, salinidad, temperatura y oxígeno, factores ambientales que permitieron desarrollar comunidades microbianas con características fisiológicas especiales. Debido a estas distintas características, el medio marino es, por lo tanto, una excelente fuente para explorar nuevas especies de microorganismos con capacidad para producir nuevos metabolitos secundarios bioactivos (Jensen *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2007; Subramani & Aalbersberg, 2012; Manivasagan *et al.*, 2014; Komaki *et al.*, 2018).

El ecosistema marino consta de componentes bióticos y abióticos, tales como sedimentos, agua (de mar y de estuarios), animales (vertebrados e invertebrados) y plantas; siendo todos ellos fuentes de microorganismos, en especial de actinobacterias capaces de producir sustancias químicas novedosas estructural y funcionalmente únicas (Piel 2004; Thornburg *et al.*, 2010), cuya versatilidad como metabolitos bioactivos aún no se conoce totalmente (Chen *et al.*, 2021).

Definitivamente, el océano alberga una amplia diversidad de microorganismos benéficos que ofrece un enorme recurso para nuevos compuestos, y está clasificado como el mayor reservorio de moléculas naturales. En este sentido, los metabolitos secundarios de las actinobacterias marinas tienen características diferentes en comparación con las de origen terrestre, ya que los ambientes marinos son altamente exigentes y competitivos. En este sentido, las actinobacterias producen una amplia gama de metabolitos secundarios, como enzimas, antibióticos, compuestos antioxidantes y citotóxicos. Estos aleloquímicos no solo protegen al huésped de otros microorganismos pelágicos circundantes, sino que también aseguran su asociación con el huésped (Majithiya & Gohel, 2022).

Las primeras actinobacterias marinas aisladas especialmente de sedimentos de aguas profundas fueron caracterizadas inicialmente como miembros terrestres temporales adaptadas a ambientes marinos (Goodfellow y Williams 1983). No obstante, estudios más recientes han demostrado que las actinobacterias marinas autóctonas ciertamente existen en los océanos (Ward y Bora 2006). Los géneros representativos de estas actinobacterias son *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* y *Actinoplanes*, los mismos que fueron considerados como los principales productores de moléculas comercialmente importantes (Mincer *et al.*, 2005).

Las actinobacterias marinas se encuentran en gran cantidad en los océanos y se pueden aislar de sedimentos, aguas y asociados a organismos vertebrados como los peces e

invertebrados como esponjas, algas, moluscos, entre otros (Dholakiya *et al.*, 2017; Siddharth *et al.*, 2019; Paderog *et al.*, 2020).

Por otro lado, la actinobacteria *Streptomyces* es el género que más frecuentemente se logra aislar; sin embargo, otros miembros que incluyen los géneros *Salinispora*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Salinibacterium*, *Marinispora*, *Verrucosipora*, entre otros han sido también aislados con cierta frecuencia (Moran *et al.* 1995; Riedlinger *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005a; Mincer *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005a; Kwon *et al.*, 2006).

En su gran mayoría tienen como requisito obligatorio el uso de agua marina para su crecimiento en el laboratorio, inclusive a concentraciones elevadas que pueden alcanzar el 10 % de NaCl (Bruns *et al.*, 2003). Asimismo, la mayoría de las especies marinas de actinobacterias aisladas se ha comprobado que producen compuestos únicos tales como las salinosporamidas, cuyo comportamiento en ensayos clínicos se mostraron como potentes agentes anticancerígenos (Feling *et al.*, 2003).

Se ha reportado diferentes géneros de actinobacterias del medio marino, la gran mayoría productores de diversos metabolitos que poseen actividades biológicas y potencial uso como agentes terapéuticos, los mismos que han sido reconocidos como compuestos policétidos, péptidos, isoprenoides, fenazinas y esteroides, las cuales a su vez han sido sugeridos como potenciales fármacos para el tratamiento enfermedades graves como el VIH, cáncer, entre otras (Ul Hassan *et al.*, 2017; Binayke *et al.*, 2018).

Una información proporcionada por De la Hoz Romo *et al.* (2022) señala que de un total de 177 trabajos de investigación analizados sobre actinobacterias marinas con actividad antimicrobiana la gran mayoría de estas actinobacterias proceden de sedimentos marinos (99/177), seguido de diversos invertebrados, destacando entre ellos las esponjas (30/177) tal como se puede observar en la Figura 5.

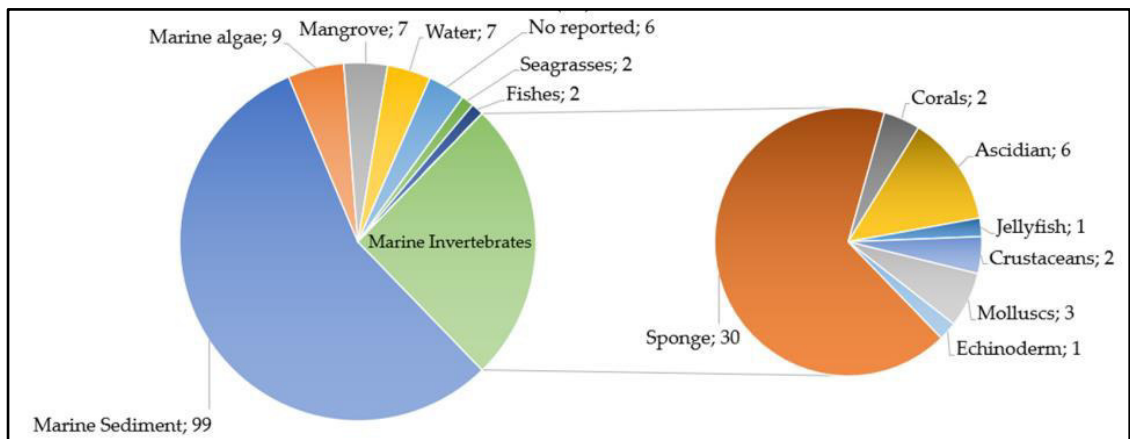


Figura 5. Fuentes de aislamiento de actinobacterias marinas con actividad antimicrobiana (De la Hoz Romo *et al.*, 2022).

Asimismo, al analizar la cantidad de artículos publicados por espacio de los últimos 20 años se evidenció una tendencia de crecimiento, siendo el más productivo el año 2022 (Figura 6). Según la descripción el género *Streptomyces* es el más reportado con actividad antimicrobiana (78 %) seguido de *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, *Salinospora* y *Verrucosisspora*. Otros géneros como *Actinomadura*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Brachybacterium*, *Rothia kristinae*, *Serinicoccus* y *Solwaraspora* fueron reportados en porcentajes menores (Figura 7)

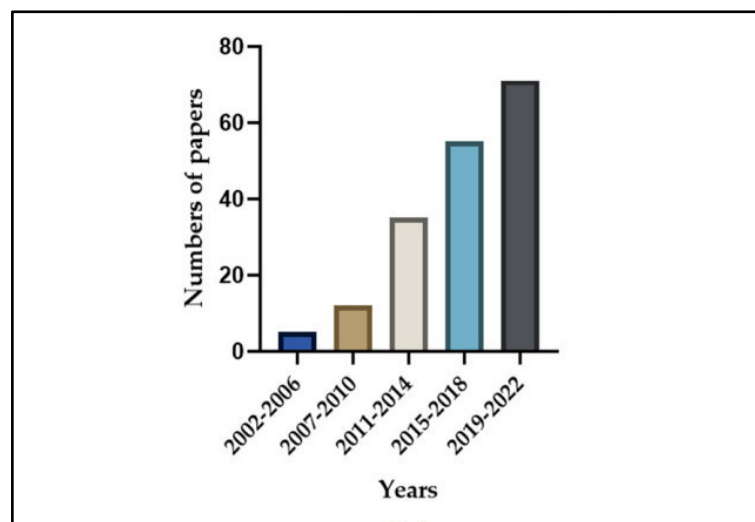


Figura 6. Publicaciones sobre actinobacterias marinas entre 2002 – 2022 (Fuente: De la Hoz Romo *et al.*, 2022).

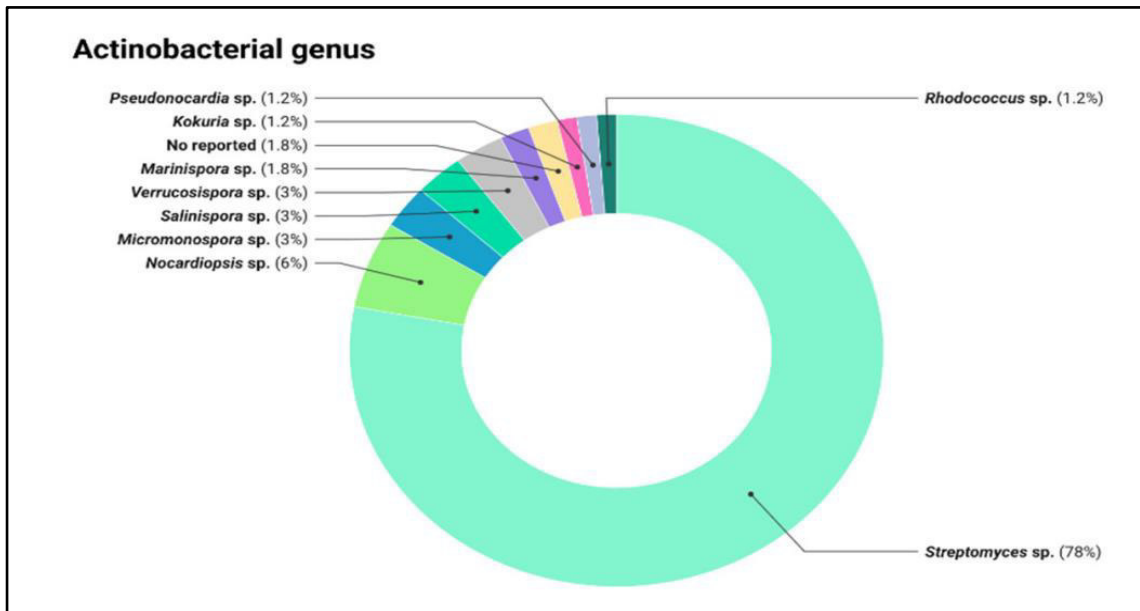


Figura 7. Géneros predominantes de actinobacterias de origen marino con actividad antimicrobiana (2002 – 2022) (Fuente: De la Hoz Romo *et al.*, 2022).

Finalmente, los mismos autores reportan, que el solvente más empleado en la obtención de extractos crudos de metabolitos bioactivos fue el acetato de etilo (Figura 8).

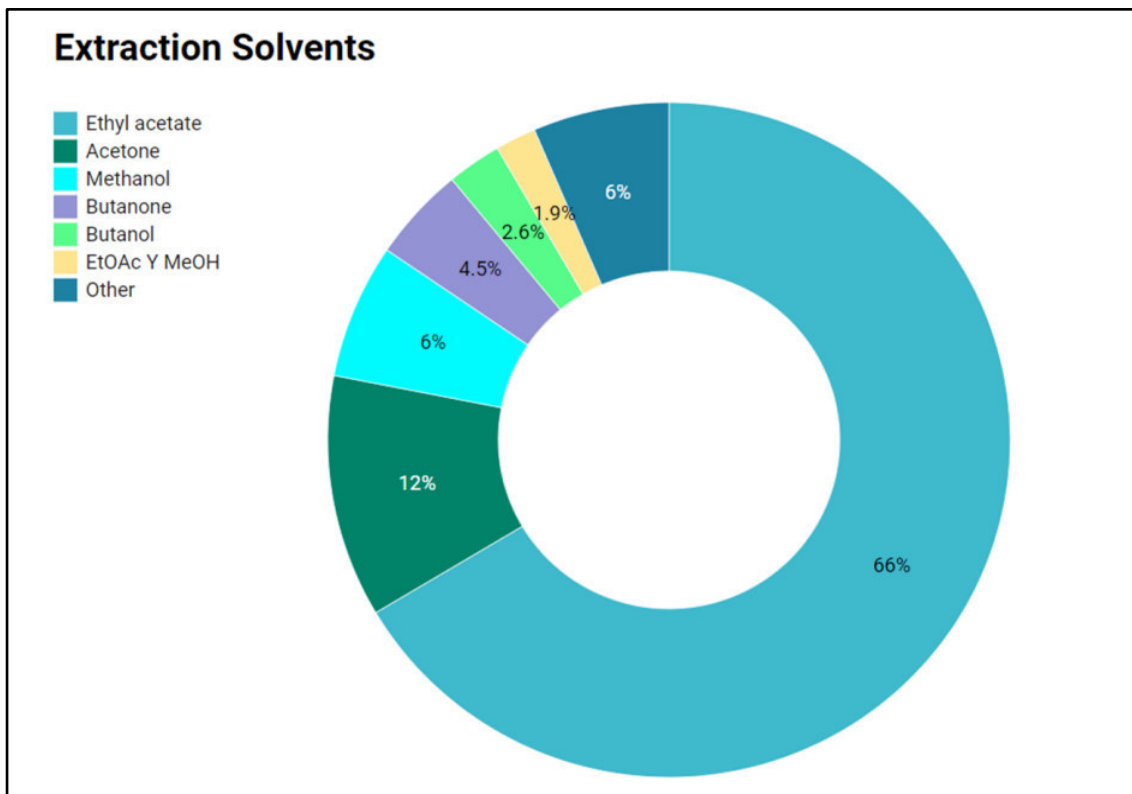


Figura 8. Disolventes orgánicos utilizados en la obtención de extractos crudos con actividad antimicrobiana (2002 – 2022) (Fuente: De la Hoz Romo *et al.*, 2022).

2.5.1.1. Actinobacterias en sedimentos marinos

Los sedimentos marinos representan el 63,5 % de la superficie de la Tierra (Stach *et al.*, 2003) y constituyen productos inorgánicos y orgánicos de la erosión de la tierra y actividades bioquímicas en el océano (Tamelander *et al.*, 2017). Los sedimentos marinos tienen una notable diversidad de comunidades microbianas que constituyen aproximadamente del 0,18 al 3,6 % de la biomasa viva total de la Tierra (Hoshino *et al.*, 2020). En este contexto, los sedimentos pueden ser de aguas someras a profundas (Iniyan *et al.*, 2021), playas arenosas (Zhang *et al.*, 2018) y sedimentos de manglares (Huang *et al.*, 2018).

Los sedimentos a pesar de ser uno de los biomas más importantes del planeta, es poco conocido por su diversidad microbiana; pero es cuantitativamente superior al del agua de mar; por ello, es considerado como uno de los hábitats marinos con mayores índices de diversidad microbiana (Patin *et al.*, 2017).

La Figura 9, muestra los principales géneros de actinobacterias del entorno marino aisladas desde sedimentos de aguas someras hasta aguas de grandes profundidades. Sin lugar a duda, el género que resalta largamente es *Streptomyces*. El éxito de las investigaciones se debe en gran parte a las nuevas tecnologías para la bioprospección de compuestos bioactivos con aplicaciones biomédicas, dando como resultado productos de alta calidad con valor agregado, definiendo de esta manera una nueva era buscando metabolitos bioactivos en sedimentos marinos (Sharma *et al.*, 2019).

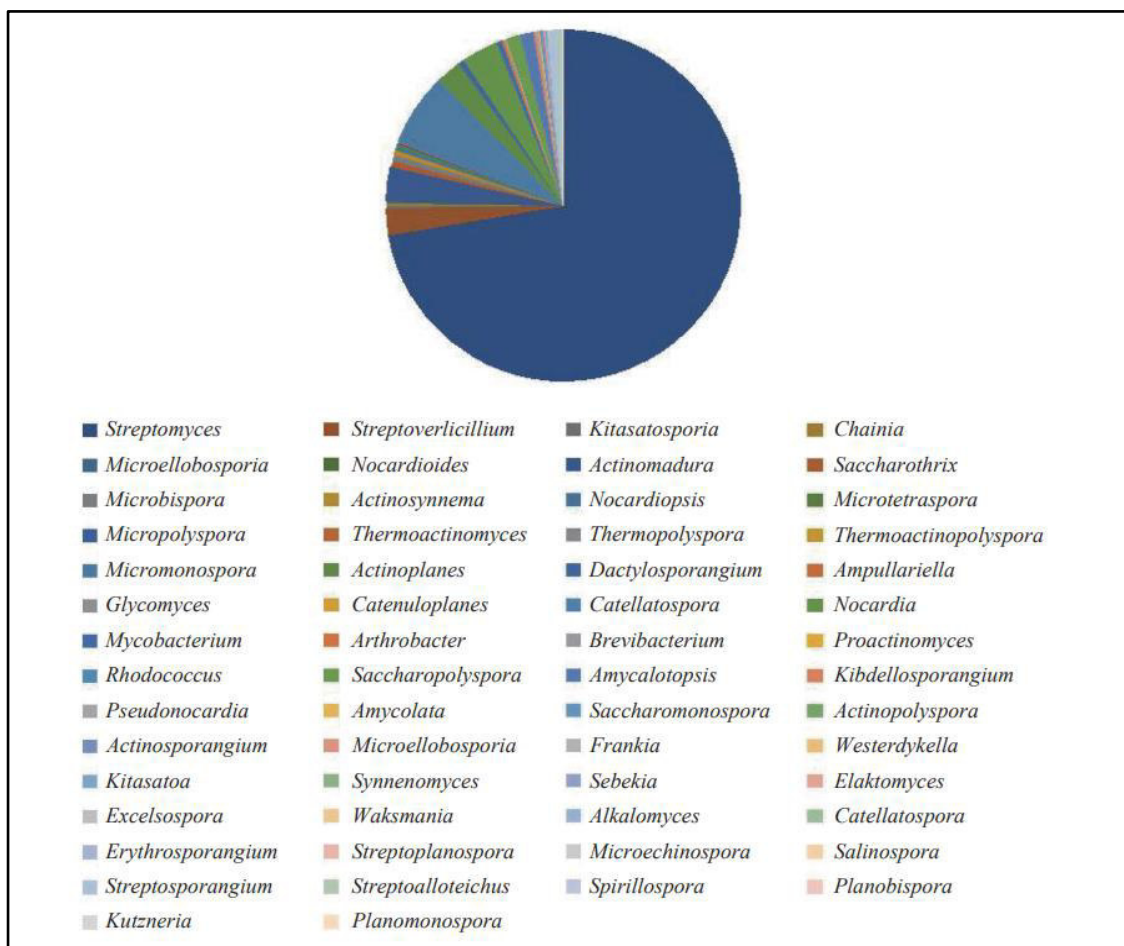


Figura 9. Principales actinobacterias productoras de metabolitos bioactivos, aisladas de sedimento marino (Fuente: Sharma Swati *et al.*, 2019).

Asimismo, exploraciones de los últimos años, resaltan al sedimento marino con particular atención debido a su notable diversidad y condiciones extremas como una fuente sin explotar para el descubrimiento de nuevas especies de actinobacterias bioactivas (Sharma *et al.*, 2019). En este sentido, se señala que hay otras especies de actinobacterias marinas (actinomicetos) de los llamados “raros” (no *Streptomyces*) con potencial capacidad para producir compuestos con propiedades antibióticas, antitumorales, antiincrustantes y citotóxicas (Subramani & Sipkema, 2019) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies nuevas de actinomicetos “raros” (no *Streptomyces*) de sedimentos marinos reportados entre 2013 - 2017 (Adaptado de: Subramani & Sipkema, 2019).

Actinobacteria (Cepa)	Familia	Muestra	Referencia
<i>Saccharomonospora amisosensis</i>	Pseudonocardiaceae	Sedimento marino (60 m)	Veyisoglu <i>et al.</i> , 2013
<i>Saccharomonospora oceani</i>	Pseudonocardiaceae	Sedimento marino	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>Actinophytocola sediminis</i>	Pseudonocardiaceae	Sedimento marino (2439 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2014a
<i>Pseudonocardia sediminis</i>	Pseudonocardiaceae	Sedimento marino profundo (652 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2014b
<i>Amycolatopsis flava</i>	Pseudonocardiaceae	Sedimento marino	Wei <i>et al.</i> , 2015
<i>Saccharopolyspora griseoalba</i>	Pseudonocardiaceae	Sedimento marino	Jiang <i>et al.</i> , 2016
<i>Amycolatopsis albispora</i>	Pseudonocardiaceae	Sedimento marino (2945 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudonocardia profundimaris</i>	Pseudonocardiaceae	Sedimento marino (7118 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2017
<i>Nocardioides pacificus</i>	Nocardioidaceae	Sedimento del subsuelo marino profundo (107,4 m)	Fan <i>et al.</i> , 2014
<i>Nocardioides nanhaiensis</i>	Nocardioidaceae	Sedimento marino (880 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2014
<i>Nocardioides antarcticus</i>	Nocardioidaceae	Sedimento marino	Deng <i>et al.</i> , 2015
<i>Nocardioides litoris</i>	Nocardioidaceae	Sedimento marino- playa	Lee <i>et al.</i> , 2017
<i>Nocardioides flavus</i>	Nocardioidaceae	Sedimento marino (7068 m)	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomonospora sediminis</i>	Nocardiopsaceae	Sedimento marino	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>Streptomonospora nanhaiensis</i>	Nocardiopsaceae	Sedimento marino (2918 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>Nocardiopsis oceani</i> , <i>N. nanhaiensis</i>	Nocardiopsaceae	Sedimento marino (2460 m)	Pan <i>et al.</i> , 2015
<i>Microbacterium hydrothermale</i>	Microbacteriaceae	Sedimento hidrotermal (2943 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2014
<i>Agromyces marinus</i>	Microbacteriaceae	Sedimento marino	Hamada <i>et al.</i> , 2014
<i>Microbacterium enclense</i>	Microbacteriaceae	Sedimento marino	Mawlankar <i>et al.</i> , 2015
<i>Microbacterium nanhaiense</i>	Microbacteriaceae	Sedimento marino (2093 m)	Yan <i>et al.</i> , 2015
<i>Zhihengliuella flava</i>	Micrococcaceae	Sedimento marino	Hamada <i>et al.</i> , 2013
<i>Kocuria indica</i>	Micrococcaceae	Sedimento marino	Dastager <i>et al.</i> , 2014
<i>Nesterenkonia alkaliphila</i>	Micrococcaceae	Sedimento marino (7118 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2015
<i>Kocuria subflava</i>	Micrococcaceae	Sedimento marino	Jiang <i>et al.</i> , 2015
<i>Luteococcus sediminum</i>	Propionibacteriaceae	Sedimento de subsuelo profundo	Fan <i>et al.</i> , 2014
<i>Mariniluteicoccus flavus</i> (novel genus)	Propionibacteriaceae	Sedimento profundo (2439 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2014
<i>Tessaracoccus lapidicaptus</i>	Propionibacteriaceae	Sedimento subsuperficial (297 m)	Puente-Sánchez <i>et al.</i> , 2014
<i>Tessaracoccus arenae</i>	Propionibacteriaceae	Sedimento marino	Thongphrom <i>et al.</i> , 2017
<i>Rhodococcus enclensis</i>	Nocardiaceae	Sedimento marino	Dastager <i>et al.</i> , 2014
<i>Nocardia jiangsuensis</i>	Nocardiaceae	Sedimento costero	Bai <i>et al.</i> , 2016
<i>Micromonospora fluostatini</i>	Micromonosporaceae	Sedimento marino	Phongsopitanun <i>et al.</i> , 2015
<i>Micromonospora yasonensis</i>	Micromonosporaceae	Sedimento marino profundo (45 m)	Veyisoglu <i>et al.</i> , 2016
<i>Micromonospora profundus</i>	Micromonosporaceae	Sedimento marino profundo (45 m)	Veyisoglu <i>et al.</i> , 2016
<i>Demequina activiva</i>	Demequinaceae	Sedimento intermareal	Park <i>et al.</i> , 2015
<i>Demequina litorisediminis</i>	Demequinaceae	Sedimento intermareal	Park <i>et al.</i> , 2016
<i>Janibacter cremeus</i>	Intrasporangiaceae	Sedimento marino	Hamada <i>et al.</i> , 2013
<i>Janibacter indicus</i>	Intrasporangiaceae	Sedimento hidrotermal	Zhang <i>et al.</i> , 2014
<i>Georgenia sediminis</i>	Bogoriellaceae	Sedimento marino profundo (141 m)	You <i>et al.</i> , 2013
<i>Georgenia subflava</i>	Bogoriellaceae	Sedimento marino (6310 m)	Wang <i>et al.</i> , 2015
<i>Ilumatobacter nonamiense</i>	Acidimicrobiaceae	Sedimento de la costa	Matsumoto <i>et al.</i> , 2013
<i>Ilumatobacter coccineum</i>	Acidimicrobiaceae	Arena de orilla de mar	Matsumoto <i>et al.</i> , 2013
<i>Sediminivirga luteola</i> (novel genus)	Brevibacteriaceae	Sedimento marino (5233 m)	Zhang <i>et al.</i> , 2016
<i>Brevibacterium sediminis</i>	Brevibacteriaceae	Sedimento marino (2461 m)	Chen <i>et al.</i> , 2016
<i>Halopolyspora alba</i> (novel genus)	Actinopolysporaceae	Sedimento marino	Lai <i>et al.</i> , 2014
<i>Haloactinomyces albus</i> (novel genus)	Actinopolysporaceae	Sedimento marino	Lai <i>et al.</i> , 2017
<i>Flaviflexus huanghaiensis</i> (novel genus)	Actinomycetaceae	Sedimento costero	Du <i>et al.</i> , 2013
<i>Paraorskovia sediminicola</i>	Cellulomonadaceae	Sedimento marino	Hamada <i>et al.</i> , 2013

2.5.1.2. Actinobacterias en esponjas marinas.

De los 34 filos de animales conocidos en la Tierra, 33 representan a animales marinos, siendo 15 exclusivos del mar. Por otro lado, muchos microorganismos marinos se encuentran en simbiosis con animales de este ecosistema, lo que indica que pueden ser ricos en recursos microbianos, incluida las actinobacterias (Valliappan *et al.*, 2014).

El Phylum Porifera, comúnmente conocido como esponjas, son considerados como uno de los grupos de animales más primitivos de nuestro planeta (Van Soest *et al.*, 2012). Son de hábitat marino, aunque también pueden estar presentes en aguas dulces; organismos sedentarios, generalmente bentónicos y grandes filtradores. Para su alimentación filtra material orgánico junto con organismos planctónicos del agua a través del transporte continuo hacia su interior (Hentschel *et al.*, 2012; Van Soest *et al.*, 2012). Evolutivamente, las esponjas han establecido relaciones simbióticas con bacterias, arqueas y hongos; de manera tal, que la biomasa microbiana puede constituir hasta un 35 – 40 % del volumen de las esponjas (Schmitt *et al.*, 2012; Webster & Taylor, 2012).

Se ha señalado que 32 filos bacterianos estarían asociados con las esponjas marinas, siendo las más abundantes Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Bacteroidetes, Acidobacteria y Cyanobacteria (Schmitt *et al.*, 2012). Por otro lado, las esponjas para su defensa de los depredadores, infestaciones microbianas, o contra el crecimiento de organismos sésiles producen una amplia gama de compuestos bioactivos (Hentschel *et al.*, 2012; Suthindhiran *et al.*, 2014), aunque las evidencias científicas actuales indican que muchos de estos compuestos pueden ser también producidos por sus microorganismos simbioses (Mehbub *et al.*, 2014).

Estudios realizados en diversas especies de esponjas marinas señalan que estos organismos albergan importantes géneros de actinobacterias (Kim *et al.*, 2006). Otros, señalan que a partir de esponjas marinas se han aislado alrededor de 60 géneros de actinobacterias. La mayoría de estas bacterias fueron aisladas de la matriz de mesohilo, pudiendo ser holobiontes verdaderos o ser tomados del agua por filtración (Li *et al.*, 2015). Alrededor de 20 géneros de actinobacterias, la mayoría pertenecientes a *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Kocuria*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora* y *Salinispora* fueron aislados de esponjas colectadas del sur de China pertenecientes a *Haliclona*, *Arenosclera*, *Amphimedon*, *Hippospongia*, *Phakellia*, *Phyllospongia*, *Agelas*, *Cinachyrella* y *Cliona* (Li *et al.*, 2015; Campana *et al.*, 2021).

De acuerdo con investigaciones realizadas en los últimos años, existe la presencia de importantes géneros nuevos de actinobacterias (de los llamados “raros”) que colonizan a numerosos invertebrados, en especial a las esponjas marinas (Tabla 2).

Tabla 2. Especies nuevas de actinomicetos “raros” simbióticos de esponjas marinas notificados durante el período de 2013 a 2017 (Fuente: Subramani & Sipkema, 2019).

Cepas	Familia	Muestra	Referencia
<i>Verrucosipora andamanensis</i>	Micromonosporaceae	Esponja marina <i>Xestospongia</i> sp.	Supong <i>et al.</i> , 2013
<i>Micromonospora spongicola</i>	Micromonosporaceae	Esponja marina de profundidad (5 m)	Supong <i>et al.</i> , 2013
<i>Saccharopolyspora spongiae</i>	Pseudonocardiaceae	Esponja marina de profundidad <i>Scopalina ruetzleri</i> (20 - 30 m)	Souza <i>et al.</i> , 2017
<i>Marmoricola aquaticus</i>	Nocardioideaceae	Esponja marina <i>Geodia corticostylifera</i>	De Menezes <i>et al.</i> , 2015
<i>Nocardia xestospongiae</i>	Nocardiaceae	Esponja marina <i>Xestospongia</i> sp.	Thawai <i>et al.</i> , 2017
<i>Rubrobacter aplysinae</i>	Rubrobacteraceae	Esponja marina <i>Aplysina aerophoba</i>	Kämpfer <i>et al.</i> , 2014
<i>Actinokineospora spheciospongiae</i>	Actinosynnemataceae	Esponja marina <i>Spheciospongia vagabunda</i>	Kämpfer <i>et al.</i> , 2015
<i>Williamsia spongiael</i>	Gordoniaceae	Esponja marina de profundidad <i>Amphimedon viridis</i> (5 a 10 m)	Afonso de Menezes <i>et al.</i> , 2017

2.6. El género dominante - *Streptomyces*

Streptomyces son bacterias Grampositivas ricas en GC (69-78 %) del orden Actinomycetales, ubicuas en la naturaleza, pudiéndose aislar de diversas fuentes, incluidas terrestres (suelo, insectos, plantas y animales), así como marinas (sedimentos, peces, corales y esponjas) (Goodfellow *et al.*, 2018; Subramani y Sipkema, 2019).

Streptomyces son de gran interés en términos de metabolitos secundarios activos con enormes potencialidades de convertirse en medicamentos; así como en agentes antimicrobianos, anticancerígenos, inmunosupresores, etc. (Takahashi & Nakashima, 2018). El potencial genético de *Streptomyces* para producir diversos metabolitos se ejemplifica en una gran cantidad de grupos de genes biosintéticos (generalmente de 20 a 40) que albergan sus genomas (Baltz, 2017).

Estudios recientes basados en la genómica comparativa de *Streptomyces* y otras actinobacterias revelan que los representantes de la misma especie aislados de diversos entornos tienen diferentes *cluster* (grupos) de genes de biosíntesis (BGC, por sus iniciales en inglés) responsables de producir metabolitos secundarios (Ian *et al.*, 2014; Ziemert *et al.*, 2014). En consecuencia, es plausible que cuando una cepa en particular se transfiere a un nuevo entorno, algunos BGC se pierden, mientras que otros que especifican la producción de compuestos benéficos sean adquiridos. Asimismo, se mencionan que algunos *Streptomyces* spp. albergan plásmidos lineales gigantes (GLP) que son autotransmisibles y transportan varios BGC (Kinashi, 2011).

Streptomyces, junto a *Thermobifida* y *Frankia* son las actinobacterias miceliales que más sobresalen; sin embargo, el género que ha recibido mayor atención es *Streptomyces* por tres razones: primero, son abundantes en todo ecosistema donde desempeñan funciones vitales principalmente en el ciclo del carbono y en la degradación de desechos orgánicos en particular los insolubles de plantas, gracias a la producción de exoenzimas hidrolíticas (Chandra & Chater, 2014). En segundo lugar, el género presenta una distribución filogenética bastante amplia (Chen *et al.*, 2021) y finalmente, *Streptomyces* es de los géneros más competentes de la naturaleza y productor de una impresionante diversidad de metabolitos secundarios bioactivos; en consecuencia, son de gran interés en la medicina y la industria (Law *et al.*, 2019).

Por otro lado, las actinobacterias producen más de dos tercios de los antibióticos naturales conocidos, y de ellas las especies de *Streptomyces* (que comprende entre 75 a 80 % de aislados) son responsables de la producción de aproximadamente 7600 metabolitos bioactivos; siendo por ello, considerado como el grupo más importante de las actinobacterias en la industria farmacéutica (Pacios-Michelena *et al.*, 2021).

El género *Streptomyces* por sí solo es responsable de aproximadamente el 80 % de los productos naturales actinobacterianos y, por lo tanto, tiene una capacidad biosintética inigualable en el mundo microbiano (Manivasagan *et al.*, 2014b; Hu *et al.*, 2015).

La búsqueda de actinomicetos "raros" (no estreptomicetos) ha aumentado en los últimos años como posibles nuevas fuentes de metabolitos secundarios para la síntesis de nuevos antibióticos; a pesar de ello, los estudios indican que *Streptomyces* sigue siendo el mayor productor de metabolitos nuevos e innovadores (Subramani & Sipkema, 2019).

Entre 2015 y 2020, 135 nuevas especies de *Streptomyces* han sido aisladas de diferentes ambientes, 108 proceden de ambientes terrestres y 27 de fuentes marinas. Asimismo, se han registrado 279 nuevos metabolitos secundarios de 121 especies de *Streptomyces* que muestran una actividad biológica diversa (Donald *et al.*, 2022).

2.6.1. *Streptomyces* como fuente de metabolitos bioactivos de origen marino

A pesar de que las actinobacterias marinas son menos estudiadas que las terrestres, los géneros que proceden de fuentes marinas albergan metabolitos bioactivos más importantes para aplicaciones biomédicas e industriales (Dharmaraj *et al.*, 2010; Subramani & Sipkema, 2019). Debido que las actinobacterias del fondo oceánico están expuestas a condiciones adversas como la alta presión, salinidad y deficiencia de nutrientes, éstas serían las razones que permitieron evolucionar genéticamente con el

tiempo para producir un perfil de metabolitos secundarios distinto de las actinobacterias terrestres (Moran *et al.*, 1995). Sin embargo, el conocimiento sobre la química, la distribución y la biodiversidad de las actinobacterias, en particular de *Streptomyces* marinos son aún bastante limitados (Tiwari & Gupta, 2013).

Los ecosistemas marinos son extremadamente dinámicos y difíciles de acceder a diferentes profundidades para los muestreos; pero, gracias al desarrollo de mecanismos de SCUBA (buceo) y nuevas estrategias de estudios actuales, hacen posible contar con nuevos conocimientos y por ende el descubrimiento de nuevos metabolitos o fármacos (Bhawsar, 2012). Los *Streptomyces* marinos existen no solo en el agua de mar y los sedimentos, también incluye otras fuentes biológicas, como esponjas, algas, corales, peces, medusas y ecosistemas como los manglares (Dharmaraj, 2010).

2.6.2. *Streptomyces* de sedimento marino y sus compuestos antimicrobianos

En las últimas décadas, ha habido un aumento significativo en el aislamiento e identificación de actinobacterias de sedimentos marinos. Esto se debe al desarrollo de técnicas modernas de estudio que permitieron conocer nuevos géneros y especies productoras de nuevos compuestos bioactivos con interés industrial y farmacéutico (Jensen *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005b).

Actinobacterias aisladas de sedimentos marinos incluyen a géneros como *Salinispora*, *Aestuariimicrobium*, *Demequina*, *Marinactinospora*, *Sciscionella*, *Paraoerskovia*, *Marisediminicola*, *Spinactinospora*, *Miniimonas*, *Sediminihabitans*, *Mariniluteicoccus*, *Flaviflexus* y *Halopolyspora* (Maldonado *et al.*, 2005a; Maldonado *et al.*, 2005b; Ward & Bora, 2006; Claverias *et al.*, 2015); sin embargo, *Streptomyces* es el género dominante prácticamente en todo el ecosistema marino del planeta incluido los sedimentos (Wang *et al.*, 2020).

Wang *et al.* (2020) resaltaron los principales compuestos antimicrobianos que derivaron de especies de *Streptomyces* sp. aislados de sedimento marino y publicados entre 2015 – 2019. Este aporte se resalta en la Tabla 3.

Tabla 3. Especies nuevas de *Streptomyces* aislados de sedimento marino y sus compuestos antimicrobianos (2015-2019) (Adaptado de Wang *et al.*, 2020).

<i>Streptomyces</i> /especie	Compuesto antibacteriano	Patógeno objetivo	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	Referencia
<i>Streptomyces</i> SNR69	Buanmicina	actividad contra cinco cepas bacterianas	oscilan entre 0,7 y 21,1 µg/mL	(Moon <i>et al.</i> , 2015).
<i>Streptomyces</i> CMB-M0150	Aranciamicinas I y J	<i>M. tuberculosis</i>	con CMI de 0,7 a 1,7 µM, respectivamente	(Khalil <i>et al.</i> 2015).
<i>Streptomyces</i> SNM5	Mohangamidas A y B	<i>C. albicans</i> ICL	IC de 4,4 y 20,5 µM, respectiv	Bae <i>et al.</i> , 2015a
<i>Streptomyces</i> SNM5	Hormaomicinas B y C	-	oscilan entre 0,23 y 114 µM	Bae <i>et al.</i> 2015b
<i>Streptomyces zhaozhouensis</i> CA-185989	Isoikarugamicina, N-metilkarugamicina 30oxo-28N-metilkarugamicina	<i>S. aureus</i> MR <i>C. albicans</i> <i>A. fumigatus</i>	2-4 µg/mL 4-8 µg/mL 4-8 µg/mL	Lacret <i>et al.</i> , 2015
<i>S. rochei</i> 06CM016	147 y 148	<i>E. coli</i> O157:H7; MRSA 11729 y <i>C. albicans</i> 5817	16, 8 y 4 µg/mL, respect 16, 16, 8 µg/mL, respect	Aksoy <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces</i> 182SMLY	N-acetil-N-desmetilmayamicina	MRSA	20,0 µM	Liang <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces</i> IMB094	Neoactinomicina A y B	MRSA y <i>Enterococcus</i> VR	16 a 64 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2017
<i>Streptomyces chartreusis</i> NA02069	Estrepchazolina A	<i>B. subtilis</i>	64 µM	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>Streptomyces</i> XMA39	Derivado Naftoquinona	Bacterias de amplio espectro	6,0 y 10,0 µg/ml	Jiang <i>et al.</i> , 2018
<i>Streptomyces</i> ZZ745	Bagremicina F y G	<i>E. coli</i>	41,8 y 67,1 µM	Zhang <i>et al.</i> , 2018b
<i>Streptomyces pratensis</i> NA-ZhouS1	Estremicina A y B	<i>P. aeruginosa</i> , MRSA, <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	18 a 16 µg/mL 6 µg/mol	Akhter <i>et al.</i> , 2018
<i>Streptomyces xinghaiensis</i> SCSIO S15077	Tunicamicina E	<i>B. thuringiensis</i> BT01, <i>B. thuringiensis</i> , <i>C. albicans</i> (ATCC 96901) y <i>C. albicans</i> CMCC (F) 98001	2,0, 0,5, 32 y 8 µg/mL, respectivamente	Zhang <i>et al.</i> , 2018c
<i>Streptomyces</i> ZZ446	Maculosina-θ-α-L-ramnopiranosido	MRSA, <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i>	37,0, 28,0 y 26,0 µg/mL, respectivamente	Chen <i>et al.</i> , 2018a
<i>Streptomyces</i> IMB7-145	Nifimicinas C-E y 17-θ-metilnifimicina	<i>C. albican</i>	8-32 µg/mL	Hu <i>et al.</i> , 2018
<i>Streptomyces mutabilis</i> sp. MII	N-acetylborrelidina B	<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i>	halos de inhibición de 8-11 mm	Hamed <i>et al.</i> , 2018a
<i>Streptomyces varsoviensis</i> HF-11225	Nivelactam B (derivado de bifenilo)	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Halo de inhibición de 9 mm	Chen <i>et al.</i> , 2018b
<i>Streptomyces</i> CNH-189	Meroindenon, Meroclorinas E y F	<i>B. subtilis</i> , <i>K. rhizophila</i> y <i>S. aureus</i>	16, 64, 128 µg/ml respec 1-2 µg/mL	Ryu <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces</i> OPM A 1245	Nosiheptida, griseoviridina y etamicina	<i>M. avium</i> JCM15430, <i>M. intracellulare</i> JCM6384 y <i>M. bovis</i> BCG	0,024, 0,024 y 0,012 µg/ml, respectivamente	Hosoda <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces</i> ZZ820	18-acetilciclooctatina, 5,18-dedihidroxiciclooctatina y 5-dehidroxiciclooctatina	MRSA y <i>E. coli</i>	MIC que oscilaron entre 24,11 y 55,12 µM	Yi <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces</i> G212	2,4-diclorofenil, 2,4-diclorobenzoato y 4,5-dihidroxi-7-metilftalida	<i>C. albicans</i> <i>E. faecalis</i>	64 µg/mL	Cao <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces</i> ZZ741	Estreptoglutarimidias A - J	<i>C. albicans</i> MRSA <i>E. coli</i>	8-20 µg/mL 9 y 11 µg/mL 8 a 12 µg/mL	Zhang <i>et al.</i> , 2019a
<i>Streptomyces atratus</i> SCSIOZH16	Atratamicina	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv	3,8 y 14,6 µM, respectivamente	Sun <i>et al.</i> , 2019

Donalds *et al.* (2022), recopilaron datos sobre 20 nuevas especies de *Streptomyces* aislados de sedimento marino entre 2015 – 2020 (Tabla 4). En este estudio, 11 nuevos *Streptomyces* spp. fueron aislados de sedimento de manglares, siendo uno de los medios de cultivo más utilizados el ISP2 (Proyecto Internacional de Streptomyces) (Ser *et al.*, 2016; Law *et al.*, 2017).

Tabla 4. Especies nuevas de *Streptomyces* spp. de sedimento marino (2015 - 2020). (Fuente: Donalds *et al.*, 2022).

Cepa	Naturaleza de la muestra	País	Referencia
<i>Streptomyces marianii</i>	Sedimento marino subintermareal	India	Iniyana <i>et al.</i> , 2021
<i>Streptomyces otsuchiensis</i>	Sedimento marino	Japón	Terahara <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces nigra</i>	Suelo de rizosfera de <i>Avicennia marina</i>	China	Chen <i>et al.</i> , 2018
<i>Streptomyces caeni</i>	Lodo de manglar	China	Huang <i>et al.</i> , 2018
<i>Streptomyces qaidamensis</i>	Arena	China	Zhang <i>et al.</i> , 2018
<i>Streptomyces monashensis</i>	Suelo del manglar	Malasia	Law <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces euryhalinus</i>	Sedimento en un bosque de manglar	India	Biswas <i>et al.</i> , 2017
<i>Streptomyces colonosanans</i>	Sedimento del suelo de manglar	Malasia	Law <i>et al.</i> , 2017
<i>Streptomyces kalpinensis</i>	Playa de agua salada	China	Ma <i>et al.</i> , 2017
<i>Streptomyces humi</i>	Suelo del manglar	Malasia	Zainal <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces littoralis</i>	Playa de agua salada	China	Ma <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces ovatisporus</i>	Sedimento marino profundo (42 m)	Turquía	Veyisoglu <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces chitinivorans</i>	Sedimento salobre de un vertedero de pescado (lago Chilika)	India	Ray <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces verrucosissporus</i>	Sedimento marino	Thailandia	Phongsopitanun <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces antioxidans</i>	Suelo de un bosque de manglares	Malasia	Ser <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces malaysiense</i>	Suelo del manglar	Malasia	Ser <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces lonarensis</i>	Sedimento de lago	India	Sharma <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces gilvigriseus</i>	Sedimento del manglar	Malasia	Ser <i>et al.</i> , 2015
<i>Streptomyces mangrovisoli</i>	Sedimento del manglar	Malasia	Ser <i>et al.</i> , 2015
<i>Streptomyces mangrovi</i>	Sedimento de manglares	Egipto	Yousif <i>et al.</i> , 2015

Se resalta el uso de NaCl como un ingrediente importante en el medio de aislamiento; así como la adición de fuentes de carbono (quitina, dextrosa, glucosa y almidón) combinadas con fuentes de carbono-nitrógeno (caseína, peptona, extracto de malta, extracto de levadura y triptona) y la adición de cicloheximida y/o nistatina como antifúngicos (Zhang *et al.*, 2018; Iniyana *et al.*, 2021).

2.6.3. *Streptomyces* de esponjas marinas y su actividad antimicrobiana

Los estudios actuales demuestran que los invertebrados, en especial esponjas marinas son fuentes primordiales de actinobacterias productores de metabolitos con actividad antimicrobiana, siendo *Streptomyces* el género dominante (Majithiya & Gohel, 2022). Son numerosos los estudios hasta la actualidad; por ello, se resume algunos ejemplos.

- A partir de *Streptomyces* sp. Ni-80 asociado a esponjas se aislaron los metabolitos urauchimicinas A y B que exhibieron actividad antifúngica contra *Candida albicans* a la CMI de 10 µg/mL (Imamura *et al.*, 1993).

- Igualmente, se obtuvieron ocho nuevas estreptofenazinas (A – H) con actividades antibacterianas de amplio espectro (valores de CIM que oscilan entre 15,6 y 62,5 µg/mL) provenientes de *Streptomyces* sp. HB202 asociada a esponjas (Mitova *et al.*, 2008).
- Otro metabolito, mayamicina exhibió actividad antibacteriana con valores de CMI entre 2,5 y 8,4 µg/mL también aislado de *Streptomyces* asociado a esponjas (Schneemann *et al.*, 2010).
- La estreptofenazina K se aisló de *Streptomyces* HB202, que mostró actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* con valores de CMI de 21,6 y 14,5 µM, respectivamente (Kunz *et al.*, 2014).
- *Streptomyces* sp. BCC45596 produjo urdamicinona E, urdamicinona G y dehidroxiaquayamicina, que fueron activos contra *Mycobacterium tuberculosis* con valores de CMI de 3,13, 12,50 y 6,25 µg/mL, respectivamente (Supong *et al.*, 2012).
- Cuatro nuevos compuestos (D1, D2, D3 y D4) de *Streptomyces* sp. LHW52447, mostraron actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* (MRSA) con valores de CMI que oscilan entre 0,125 y 1,0 µg/mL (Jiao *et al.*, 2018).

En general, los invertebrados marinos, incluidas las esponjas son organismos menos explorados, pero sigue siendo una fuente prometedora de nuevos productos naturales e innovadores para buscar urgentemente nuevos compuestos bioactivos (Nair *et al.*, 2020). Entre las actinobacterias, en especial las que se asocian a las esponjas resalta especies nuevas de *Streptomyces* ssp. (Tabla 5).

Tabla 5. Especies nuevas de *Streptomyces* de algunos vertebrados e invertebrados marinos (2015 - 2020) (Fuente: Donalds *et al.*, 2022).

Cepa	Naturaleza de la muestra	País	Referencia
<i>Streptomyces reniochaliniae</i>	LHW50302T de <i>Reniochalina stalagmitis</i>	China	Li <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces diacami</i>	LHW51701T de <i>Diacamus megaspinorhabdosa</i>	China	Li <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces tirandamycinicus</i>	Esponja marina	China	Blockley <i>et al.</i> , 2017
<i>Streptomyces zhaozhouensis</i> subsp. <i>mycale</i>	Esponja marina (<i>Mycale</i> sp.)	India	Dhaneesha <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces atlanticus</i>	Esponja marina (<i>Aplysina fulva</i>)	Brasil	Silva <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces hyaluromycini</i>	Tunicata (<i>Molgula manhattensis</i>)	Japón	Harunari <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces bohaiensis</i>	Pez juvenil de la especie <i>Scomberomorus nipponius</i>	China	Pan <i>et al.</i> , 2015
<i>Streptomyces spongicola</i>	Esponja marina	China	Huang <i>et al.</i> , 2016

2.7. Perspectivas de las actinobacterias marinas.

Las actinobacterias marinas han despertado el interés de los investigadores en los últimos años, no solo por su diversidad taxonómica e importancia ecológica, también por la posibilidad de biosíntesis de nuevos productos biotecnológicos (Dharmaraj, 2010). A pesar de intensas investigaciones y el esfuerzo de aislamiento de actinobacterias, los océanos siguen siendo ecosistemas poco explorados para estos microorganismos y sus metabolitos (Stach & Bull, 2005; Manivasagan *et al.*, 2014). Con el advenimiento de tecnologías y nuevos enfoques, se ha demostrado la presencia de actinobacterias y sus grupos de genes de biosíntesis en los diversos océanos y su distribución en diferentes ecosistemas; en consecuencia, aún hay demasiado margen para la investigación avanzada y para explorar el potencial de nuevas actinobacterias marinas como productores de nuevos metabolitos secundarios bioactivos (De la Hoz-Romo, 2022).

Se estima que los compuestos naturales provenientes de fuentes vivas oscilan entre 300.000 y 600.000; de ellos, los microorganismos aportan unos 60.000 - 80.000 (Abdel-Razek *et al.*, 2020). Más del 60 % de los compuestos fueron aislados solo de actinobacterias, la mayoría (39 %) son producidos por el género *Streptomyces*, entre ellos estreptomycin, actinomicina, macrólidos de polieno, estreptotricinas, aminoglucósidos, ciclopilactonas, péptidos de quinoxalina y antraciclinas (Subramani & Sipkema, 2019).

Otros reportes indican que, de aproximadamente 23000 metabolitos secundarios producidos por microorganismos, 10000 son producidos por actinomicetos, lo que representa el 45 % de todos los metabolitos microbianos bioactivos (Berdy, 2005). Sin embargo, reportes últimos señalan que las Actinobacterias producen más de dos tercios de los antibióticos naturales, y las especies de *Streptomyces* representan más del 75 %, siendo responsable de alrededor de 7600 metabolitos bioactivos de importancia farmacéutica (Pacios-Michelena *et al.*, 2021).

Se resalta aquellas actinobacterias que se asocian con otros organismos marinos para producir metabolitos bioactivos, siendo los invertebrados tales como esponjas, corales, ascidias, equinodermos y vertebrados como peces fuentes significativas en la búsqueda de metabolitos bioactivos (Jagannathan *et al.*, 2021). Asimismo, se resalta la diversidad taxonómica en la producción de los metabolitos secundarios bioactivos, siendo *Streptomyces* (68 %), *Micromonospora* (6 %) y *Nocardiosis* (3 %) los géneros más dominantes; además, los alcaloides (37 %), policétidos (33 %) y péptidos (15 %) los productos naturales con mayor actividad antimicrobiana (Chen *et al.*, 2021).

Los enfoques cultivables y el análisis metagenómico muestran que muchos invertebrados albergan especies de actinobacterias. Estas especies pertenecen principalmente a los géneros *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Salinospora*, *Kocuria*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* y *Actinokinespora* (Hifnawy *et al.*, 2020; Krishnamoorthy *et al.*, 2020; Ramesh *et al.*, 2021).

Según un análisis estadístico de productos naturales microbianos marinos de 2010 a 2013, las actinobacterias de origen marino representan el 28 % (= 253/895) de los nuevos productos naturales de origen microbiano aislados de ecosistemas marinos (Zhao *et al.*, 2013). Asimismo, Wang *et al.*, (2020) revisaron las fuentes, estructuras y actividades antimicrobianas de 313 metabolitos de actinobacterias marinas obtenidos entre 1976 – 2019, llegando a determinar que se trata de nuevos compuestos (87 %) con estructuras químicas nuevas y la gran mayoría con actividad antibacteriana. Estos compuestos incluyeron policétidos, compuestos nitrogenados, esteroides y terpenoides.

Finalmente, revisiones de los últimos años indican que las actinobacterias marinas cuentan con amplias potencialidades de aplicación en diversos campos de la ciencia y tecnología, gracias a su capacidad de biosíntesis de nuevos productos de interés biotecnológico. En la Figura 10 se resume los metabolitos secundarios de las actinobacterias marinas con diversas funciones como antimicrobianos, agentes antitumorales, antihelmínticos y antifúngicos; muchos de ellos actualmente en circulación para diversos tratamientos biomédicos; pero también se están explorando como fuentes potenciales de nuevos compuestos para combatir patógenos resistentes a múltiples fármacos. En otros casos se plantea su potencial uso para resolver problemas ambientales, en particular en la biorremediación de ecosistemas impactados por pesticidas, metales pesados o tóxicos, desechos radiactivos y bio-incrustaciones. A nivel industrial se vislumbra el uso de estos productos como biocombustibles, detergentes, conservantes/aditivos de alimentos, entre otros (Jagannathan *et al.*, 2021).

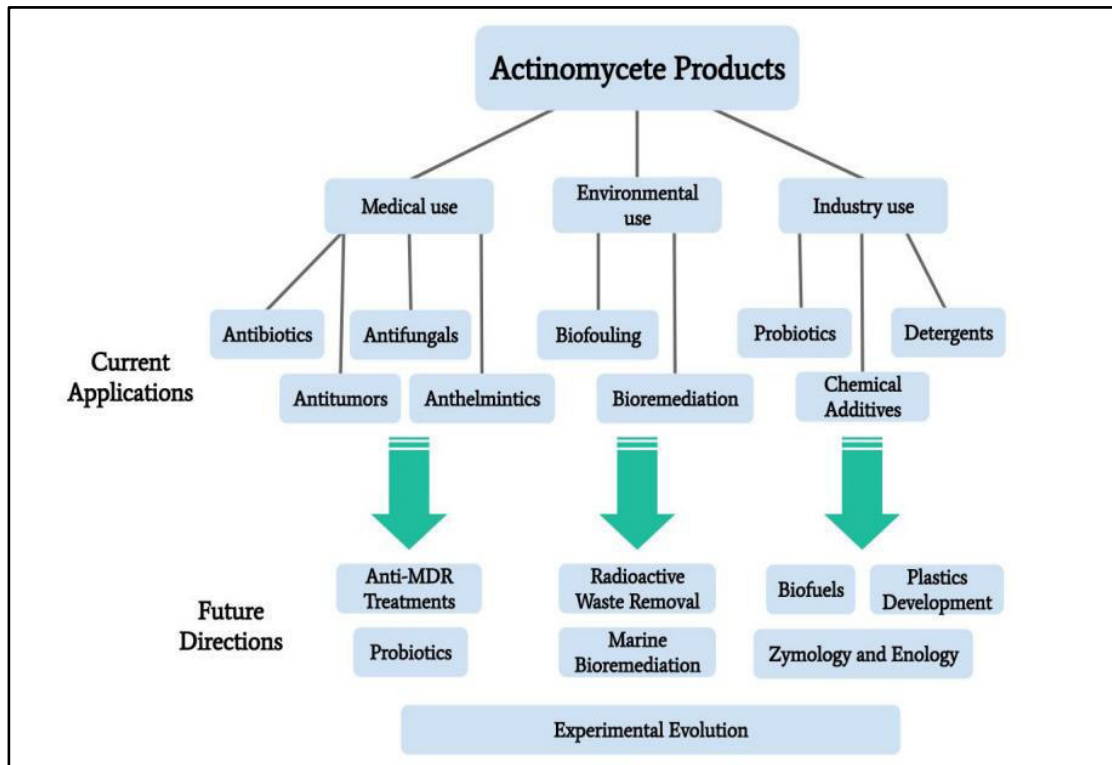


Figura 10. Principales aplicaciones de las actinobacterias marinas y perspectivas de uso en el futuro (Fuente: Jagannathan *et al.*, 2021).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Las Actinobacterias aisladas de sedimento marino y esponjas de la costa centro-sur del Perú son productoras de sustancias bioactivas con actividad inhibitoria contra patógenos multidrogosresistentes.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana de las actinobacterias marinas aisladas de sedimentos y esponjas de la costa centro - sur del Perú contra patógenos multidrogosresistentes de origen hospitalario.

3.2.2. Objetivos específicos

- a. Caracterizar morfológicamente actinobacterias aisladas de sedimentos y esponjas marinas, mediante la descripción de su comportamiento cultural en medios microbiológicos convencionales y observaciones de microscopía óptica y electrónica de barrido.
- b. Evaluar el potencial antimicrobiano de actinobacterias aisladas de sedimento marino y esponjas enfrentando a bacterias patógenas MDR Gram positivas y Gram negativas; así como frente a cepas de *Candida albicans*, todas de origen clínico.
- c. Determinar el potencial antimicrobiano de extractos orgánicos de actinobacterias seleccionadas por su mayor capacidad inhibitoria de patógenos MDR, mediante pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente y *Enterococcus faecalis* vancomicina-resistente.
- d. Identificar filogenéticamente mediante secuenciamiento del RNAr 16S de las actinobacterias seleccionadas por su mayor capacidad inhibitoria de patógenos multidrogosresistentes.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

- Sedimento marino, recolectados frente a la Bahía de Ancón, Lima – Perú, (campana 2008).
- Sedimento marino, recolectados frente a la Bahía de Independencia, Ica – Perú (campana 2008).
- Esponjas marinas recolectadas en las bahías de Pucusana (Lima) y San Juan de Marcona (Ica) (campana 2018).

4.2. Cepas de microorganismos indicadores

Cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ambos meticilino-resistentes) al igual que *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (vancomicina resistente) y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (vancomicina sensible) fueron proporcionados por el doctor Jesús Tamariz de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. Estas cepas fueron utilizadas en las pruebas de actividad antimicrobiana como testigos referenciales.

Los patógenos MDR de origen clínico pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* cepa 657 y *Staphylococcus aureus* cepa 457, así como las levaduras *Candida albicans* cepa 1511, *Candida albicans* cepa 1511 MIC, *Candida albicans* C1415, *Candida albicans* B4606, *Candida albicans* B4604, *Candida albicans* C1656 y *Candida albicans* C157; todas pertenecientes a la colección del Servicio de Microbiología, Instituto Especializado de Salud del Niño fueron donadas por el doctor Rito Zerpa Larrauri (†).

Los patógenos MDR de origen clínico pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* 149, *Pseudomonas aeruginosa* 303, *Escherichia coli* 302, *Enterobacter aerogenes* 171, *Klebsiella* 184 y *Acinetobacter* 134; así como, *Enterococcus sp.* 239, *Staphylococcus aureus* 1094, *Staphylococcus epidermidis* 1093 y *Staphylococcus coagulasa* negativo 348, fueron donadas por el Hospital de Emergencias “Casimiro Ulloa”.

Los patógenos MDR de origen clínico (aislados de muestras de orina patológica), identificadas y tipificadas como multirresistentes pertenecientes a *S. aureus* MR, *Enterococcus sp.* VR, *E. coli* BLEE+, *E. coli* AMPc y *P. mirabilis* BLEE+ fueron utilizados como indicadores en la actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de esponjas, fueron proporcionados por un centro hospitalario nivel II de Lima – Perú.

4.3. Lugares de colecta

4.3.1. Muestreo de sedimento marino

Para el presente estudio, cuatro ubicaciones clave en la costa central de Perú fueron elegidos lugares de muestreo georeferenciadas. Mediante campañas de muestreo mensual se recogieron 24 muestras de sedimento marino, las mismas que fueron colectadas mediante el método del dragado de 15 y 34 m de profundidad y excepcionalmente 100 m de profundidad. Los lugares elegidos fueron, Ancón – Lima (Figura 11, Tabla 6) y Paracas – Ica (Figura 12 y Tabla 6). Las muestras de sedimento fueron colectadas asépticamente y puestas en tubos esterilizados para ser transportadas en refrigeración (4 °C), para su procesamiento y análisis microbiológico dentro de las 24 horas siguientes en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología del Instituto de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi (ICBAR) - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

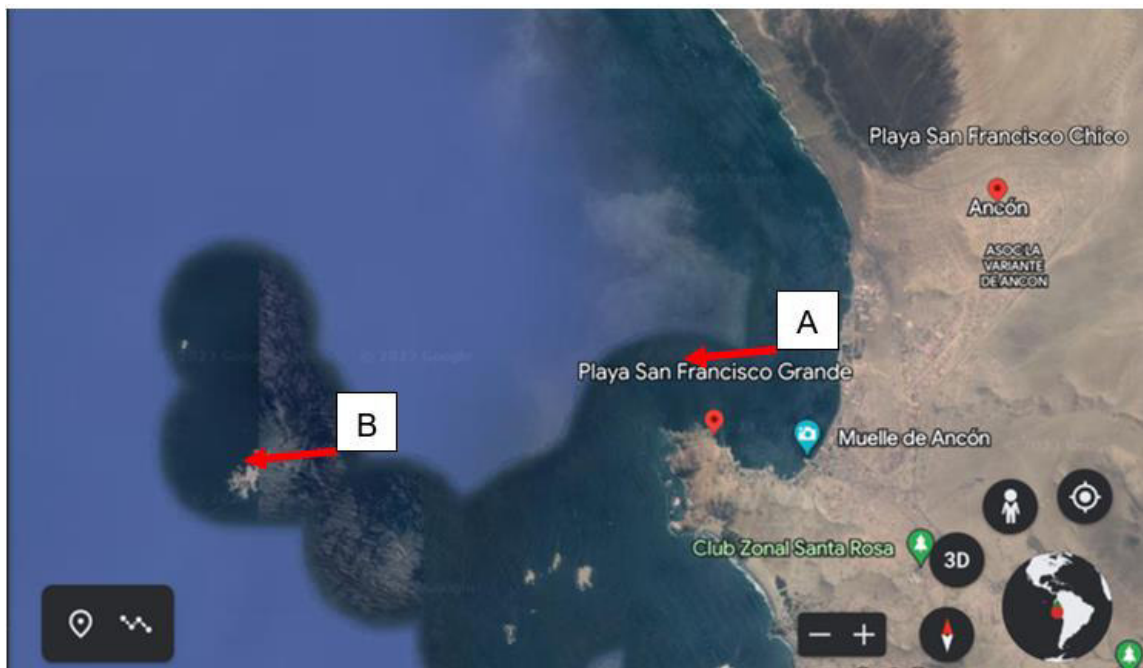


Figura 11. Lugares de colecta de sedimento marino frente a Ancón – Lima. **A:** Playa San Francisco (15 y 34 m de profundidad); **B:** Isla “las Panchas” (100 m de profundidad) (Fuente: Google Earth)

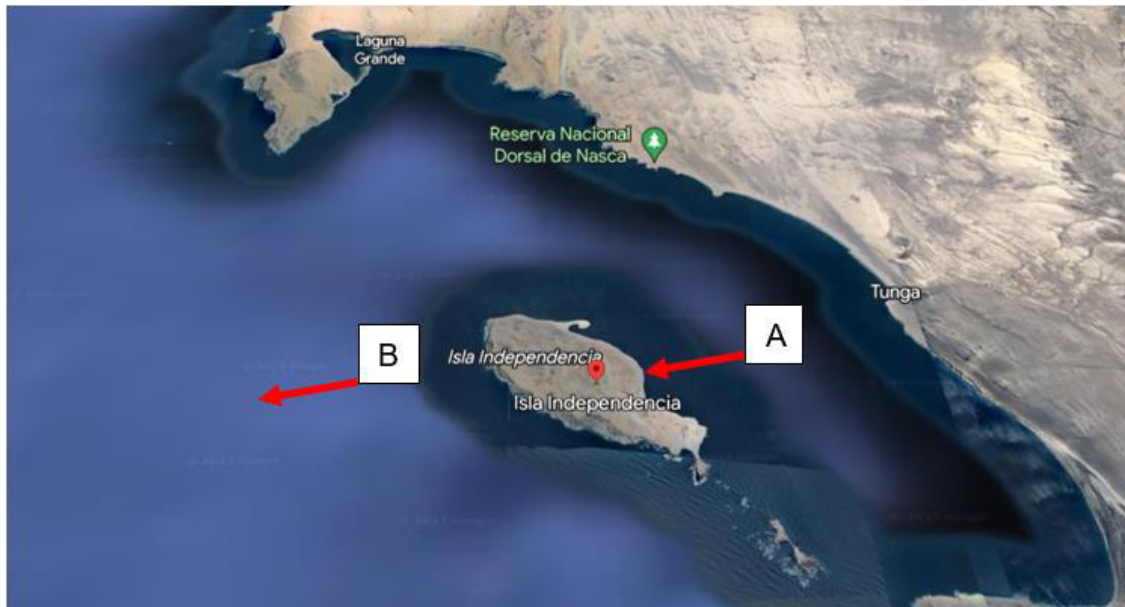


Figura 12. Lugares de colecta de muestras de sedimento en Paracas (Ica – Perú). **A:** Isla La Vieja; **B:** Bahía Independencia. (Fuente: Google Earth).

Tabla 6. Lugares de colecta de sedimentos para el aislamiento de actinomicetos.

Lugares de colecta	A	B
	(15 y 34 m de profundidad)	(100 m de profundidad)
Ancón (Lima)	Playa San Francisco	Isla “las Panchas”
• Coordenadas	(11°45’37’’S;77°11’32’’W)	(11°46’12’’S;77°15’35’’W)
• N° de muestras.	(9)	(3)
Paracas (Ica)	A	B
	Isla La Vieja	Bahía Independencia
• Coordenadas	(14°17’16’’S;76°13’42’’W)	(14°19’05’’S;77°15’22’’W)
• N° de muestras	(9)	(3)

4.3.2. Muestreo de esponjas

Las esponjas se colectaron en dos orillas rocosas intermareales: playa Las Ninfas (Pucusana - Lima) (Figura 13, Tabla 7) y playa Hermosa (Marcona – Ica) (Figura 14, Tabla 7). Las esponjas fueron colectadas manualmente con ayuda de espátulas, solo excepcionalmente mediante apnea (Figura 15); de inmediato fueron colocadas en bolsas herméticas (tipo ziplocs) con agua de mar estéril y luego transportadas en

refrigeración (4 °C) al Laboratorio de Ecología Microbiana – Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su procesamiento y evaluación microbiológica.



Figura 13. Lugar de colecta de esponjas en la playa las Ninfas en Pucusana (Lima – Perú).



Figura 14. Lugares de colecta de esponjas marinas en la playa Hermosa de Marcona (Ica – Perú). **A:** Orilla rocosa; **B:** rocas sumergidas (Fuente: Google Earth).

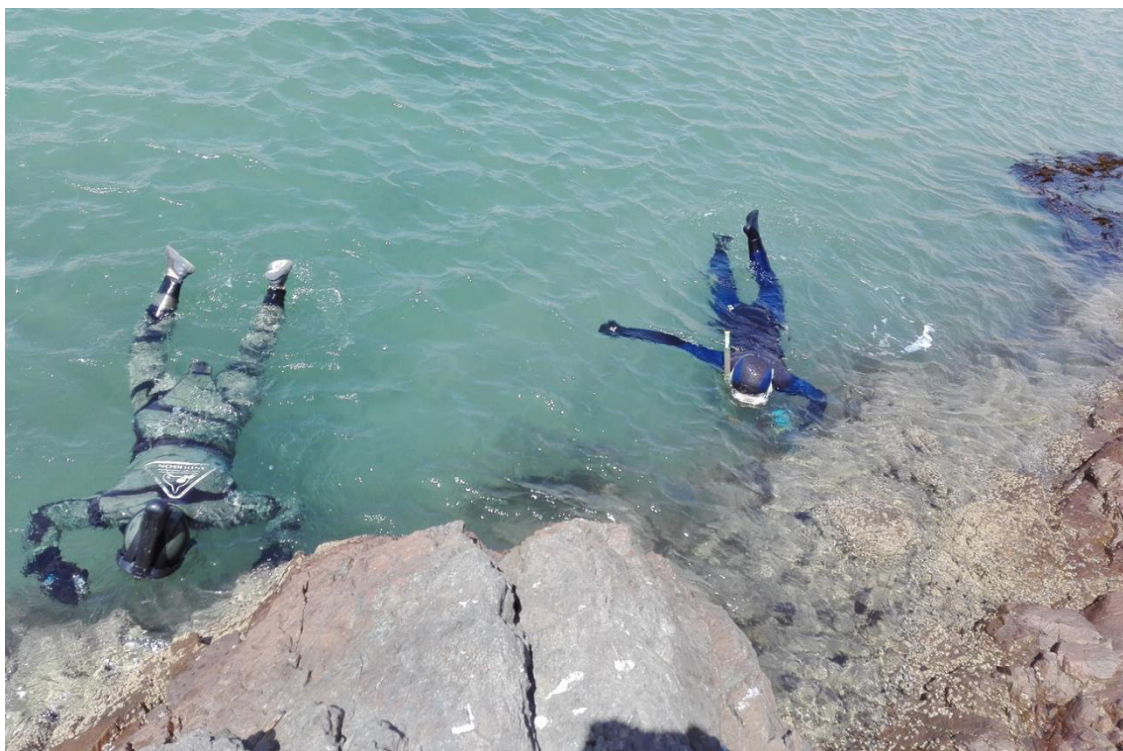


Figura 15. Muestreo en la orilla rocosa en playa Hermosa – San Juan de Marcona, Ica – Perú.

En todos los casos se tomaron datos de temperatura, salinidad y pH del agua y sedimento del lugar de colecta.

Tabla 7. Lugares de colecta de esponjas para el aislamiento de actinomicetos marinos.

Lugar	Puntos de muestreo	
	A	B
Pucusana (Lima - Perú)	Playa las Ninfas	
• Coordenadas	(12°28'48''S;76°48'03''W)	
• N° de muestras.	(16)	
Marcona (Ica – Perú)	A	B
	Playa Hermosa (orilla rocosa)	Playa Hermosa (roca sumergida)
• Coordenadas	(15°21'20''S;75°10'17''W)	(15°21'14''S;75°10'05''W)
• N° de muestras	(8)	(7)

Las muestras de esponjas fueron recolectadas de manera selectiva, asegurando que la base de la esponja permanezca intacta de manera tal que puedan regenerarse. En el caso de las muestras intermareales la colecta se realizó manualmente; mientras que las muestras submareales fueron a través de la apnea (buceo).

4.4. Procesamiento de muestras de sedimento y aislamiento de actinomicetos

Con la finalidad de eliminar el microbiota vegetativo que acompaña a las muestras de sedimento, éstas fueron procesadas por dos métodos: el método I (en húmedo), que consiste en colocar 20 g de muestra en placas estériles para luego someter a un tratamiento térmico a 50 °C por 60 min en baño maría (Pisano *et al.*, 1986; Takizawa *et al.*, 1993); el método II (en seco), un procedimiento similar al anterior, pero colocando las muestras en una estufa en calor seco (León *et al.*, 2007). Luego de estos tratamientos se hicieron diluciones seriadas al décimo en agua de mar estéril hasta 10^{-5} . De cada muestra diluida se sembró 0,1 ml en Agar Marino (AM) y Agar Czapeck Dox (CZ) preparados con agua de mar natural más Cicloheximide (Sigma-Aldrich) (10 µg/mL) como agente antifúngico y ácido nalidíxico (Merck) (15 µg/ml) como agente antibacteriano. Los cultivos fueron sometidos a incubación a 28 °C durante 15 a 21 días (Kokare *et al.*, 2004). Las colonias presuntivas y típicas de Actinobacterias se repicaron en ceparios de Agar Marino (AM) más glicerina (20 % v/v) para estudios posteriores.

4.5. Procesamiento de muestras de esponjas y aislamiento de actinomicetos

Las muestras de esponjas se seccionaron asépticamente con un bisturí estéril y 2 g fue transferido a un mortero que contenía 18 mL de agua marina esterilizada donde fueron triturados y luego diluidos al décimo hasta 10^{-5} . Se cultivaron en Agar Marino (AM) y Agar Almidón Caseína (AAC) preparados con agua marina y suplementados con ácido nalidíxico (15 µg/ml) y cicloheximide (50 µg/ml) (León *et al.*, 2007). Los cultivos se incubaron a 28 °C por 3 a 4 semanas. Las colonias presuntivas con características de actinomicetos fueron mantenidas en ceparios de Caldo Marino (CM) adicionados con glicerina (20 % v/v).

4.6. Caracterización de cultivos de actinomicetos

Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de actinobacterias aisladas tanto de sedimentos como de esponjas se realizaron de acuerdo con las pautas metodológicas y la guía de identificación de Actinomicetos (esquemas de Holt *et al.* 1994). Igualmente, las características de cultivos de actinobacterias marinas en medio líquido y sólido fueron descritas según su crecimiento en el Caldo Marino y Agar Marino respectivamente (León *et al.*, 2007). Para la observación de estructuras miceliales tanto de sustrato como el aéreo se realizaron microcultivos siguiendo el método de “bloques de agar” y/o “laminilla en plano inclinado” incubados en cámara húmeda a 28 °C por 5 - 7 días (Pérez *et al.*, 2015). Asimismo, para su observación microscópica convencional a 100X se aplicaron la técnica tradicional de la coloración Gram.

4.7. Determinación del perfil de resistencia antibiótica de cepas indicadoras

Las bacterias indicadoras de origen clínico y los cultivos de referencia ATCC mantenidos en Caldo Tripticasa de Soya (TSB) más glicerol (20 %) fueron reactivadas y evaluadas por su sensibilidad frente a diez antibióticos estándar (CLSI, 2010). Esta evaluación fue necesaria para corroborar el carácter de multirresistente de las cepas testigo tanto Gram positivas como Gram negativas. Las cepas fueron ajustadas a una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (INS, 2002). Se sembraron en placas del medio Mueller Hinton (BD Difco) según el método de difusión de discos o técnica de Kirby-Bauer usando hisopos estériles. Tomando en cuenta las indicaciones de CLSI para pruebas de susceptibilidad para Gram positivos y Gram negativos, los discos de antibióticos (Oxoid - Thermo Fisher Scientific) se colocaron sobre los cultivos en la superficie del agar usando pinzas estériles. Los antibióticos incluyeron, para los Gram negativos: Amikacina (30µg), Amoxicilina (25µg), Ampicilina + sulbactam (10/10µg), Aztreonam (30µg), Cefalexina (30µg), Cefepime (30µg), Ceftazidima (30µg), Cefuroxima (30µg), Ciprofloxacino (5µg), Cloranfenicol (30µg), Meropenem (10µg), Trimetropin + Sulfametoxazol (25µg), Tetraciclina (30 µg) y para los Gram positivos: Ácido nalidíxico (30 µg), Amikacina (30 µg), Amoxicilina (25 µg), Amoxicilina + clavulanato (30 µg), Ampicilina + sulbactam (10/10 µg), Bacitracina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Cefepime (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Cefuroxima (30 µg), Ciprofloxacino (5 µg), Claritromicina (15 µg), Dicloxacilina (1 µg), Eritromicina (15 µg), Gentamicina (10 µg), Levofloxacina (5 µg), Meropenem (10 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Norfloxacino (10 µg), Optoquina (5 µg), Trimetropin + Sulfametoxazol (25 µg), Vancomicina (30 µg). Los cultivos se incubaron a 37 °C por 48 h. Luego de este tiempo fueron evaluados por su actividad antibiótica midiendo las zonas de inhibición de cada antibiótico ya sea como sensibles (S), intermedio (I) o resistentes (R) según sea el caso.

4.8. Determinación de la actividad antimicrobiana

4.8.1. Mantenimiento de cepas indicadoras

Todas las cepas patógenas MDR de procedencia hospitalaria (cepas peruanas), así como las cepas estándar (ATCC) de *Staphylococcus aureus* metilino – resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina – resistentes y vancomicina – sensibles fueron conservadas en ceparios mediante subcultivos en el Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Caldo Tripticasa Soya (TSB) pero con la adición de Glicerina al 20 % (v/v). Para permitir la viabilidad fueron subcultivadas cada 3 semanas en Agar Tripticasa Soya (TSA) o Agar BHI. Por su parte, las cepas de *Candida albicans* fueron subcultivadas y

mantenidas en el Agar Extracto de Levadura – Peptona- Glucosado (YPG) e incubadas a la temperatura del laboratorio.

4.8.2. Tamizaje preliminar de la actividad antibacteriana

Para las pruebas de tamizaje primario se aplicó el método de “doble capa” de Westerdahl *et al.*, (1991) modificado por León y García - Tello (1998). Los actinomicetos que fueron aislados de sedimentos, previa reactivación en Caldo Marino fue sembrada como macrocolonias en Agar Marino pH 7,6 e incubadas a 28 °C por 5 - 7 días. Para determinar la actividad antibacteriana, las cepas indicadoras MDR *Pseudomonas aeruginosa* cepa 657, *Staphylococcus aureus* cepa 457; *Pseudomonas aeruginosa* 149, *Pseudomonas aeruginosa* 303, *Escherichia coli* 302, *Enterobacter aerogenes* 171, *Klebsiella* 184, *Acinetobacter* 134, *Enterococcus sp.* 239, *Staphylococcus aureus* 1094, *Staphylococcus epidermidis* 1093, *Staphylococcus coagulasa* negativo, así como las cepas estándar de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) y *Enterococcus vancomicina* resistentes (VRE), debidamente reactivadas en el medio Caldo Trypticasa Soya (TSB, por sus iniciales en inglés) y previamente ajustadas a la concentración de 10⁶ UFC/mL (escala 0,5 de Mc Farland), fueron incorporadas como cepas testigo en estado semisólido como una “segunda capa” cubriendo en lo posible los cultivos de los actinomicetos marinos. Los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 a 48 h. Al cabo de este tiempo, se realizaron las lecturas mediante las mediciones de los halos de inhibición, utilizando para ello un Vernier.

Bajo las mismas condiciones se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de esponjas; sin embargo, los indicadores utilizados en este caso fueron bacterias uropatógenas drogorresistentes (*Staphylococcus aureus* MR, *Enterococcus* Van R, *E. coli* BLEE+, *E. coli* ampC y *Proteus mirabilis* BLEE+). Los actinomicetos se sembraron en Agar Trypticasa Soya (TSA) preparados con agua de mar (75 %), incubados a 28 °C por 5 a 7 días. Las patógenas MDR reactivadas se inocularon en un medio semisólido (TSB) a 50 °C (0,5 de la escala McFarland), se vertieron en la superficie de los cultivos de actinomicetos. Se incubaron a 37 °C por 24 h y la actividad antibacteriana se definió por la formación de halos de inhibición.

4.8.3. Tamizaje preliminar de la actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica de los actinomicetos aislados de sedimento marino frente a las cepas de levaduras *Candida albicans* se realizó de manera similar que para las bacterias ya citadas anteriormente. Para ello, el medio semisólido Extracto de Levadura-Peptona - Glucosado (YPG) distribuido en tubos (4 mL) y mantenidos a

50°C fueron inoculados (0,5 de la escala McFarland) con cultivos reactivados de *Candida albicans*, los cuales fueron agregados sobre las colonias de actinomicetos de modo similar a “doble capa o segunda capa” (Westerdahl *et al.*, 1991). Una vez solidificado fueron incubados a 30 °C por 48 h. Se determinó la actividad antifúngica de los actinomicetos midiendo el diámetro de los halos de inhibición con la ayuda de un Vernier. Igualmente, las pruebas se realizaron por triplicado.

4.8.4. Determinación del porcentaje inhibitorio de actinomicetos aislados

En función de los hallazgos iniciales de la actividad antimicrobiana de los aislados se seleccionaron aquellos actinomicetos que presentaron mayor potencial inhibitorio de los indicadores patógenos. Bajo el mismo criterio ya señalado se sembraron los actinomicetos seleccionados por triplicado en Agar Marino, incubando por 7 días a 28° C para luego ensayar el método de “segunda capa” (“doble capa”) (León y García-Tello, 1998) para luego enfrentar a los patógenos Gram positivos y Gram negativos previa incubación a 37° C por 24 – 48 h. Finalmente, se determinó los porcentajes de inhibición de crecimiento radial (PICR) en cada caso según la fórmula de Skidmore y Dickinson (1976): $PICR = [(R1-R2)/R1] \times 100$. Donde, R1 es el radio (promedio) del halo de inhibición al testigo y R2 es el radio (promedio) del tamaño circular de las colonias de actinomicetos en prueba.

4.9. Fermentación, extracción y pruebas de actividad antimicrobiana del extracto crudo

Sobre la base de su mayor actividad antimicrobiana frente a los patógenos MDR fueron seleccionadas cuatro (4) cepas de actinomicetos aislados de sedimentos marinos (cepas I-434A, I-434B, MC 300 y M10 – 77). Estas cepas, fueron cultivadas en Caldo Marino y Caldo Almidón Caseína como medios de producción para obtener los extractos crudos; para ello, se utilizaron solventes orgánicos de polaridades crecientes (acetato de etilo, n-butanol y diclorometano) siguiendo procedimientos descritos por Zheng *et al.* (2004). Los caldos de cultivo fueron mantenidos en constante agitación a 150 rpm a 28 °C por 15 días, protegidos con papel aluminio. Al cabo del tiempo, los cultivos se centrifugaron a 4800 rpm por 30 minutos, se filtró el sobrenadante (papel Whatman N° 1) y se trató con su respectivo solvente orgánico (v/v) y agitado vigorosamente varias veces con intervalos de 5 a 10 min hasta por una hora. La mezcla fue mantenida toda una noche en refrigeración. La fase orgánica que contuvo el compuesto activo fue separada de la fase acuosa (en una pera de decantación) mediante dos extracciones consecutivas y luego evaporada hasta sequedad en un evaporador rotatorio (RVO 400)

mantenido a 40° C y a presión reducida (Ahsan *et al.*, 2017). El residuo obtenido se pesó y se guardó en recipientes con tapa hermética para su uso posterior en estudios de sensibilidad *in vitro* de bacterias MDR a antimicrobianos naturales.

Para verificar que los extractos crudos cuentan con actividad antimicrobiana se procedió a evaluar frente a las cepas estándar (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) mediante el método de “inoculación directa en placa” (León *et al.*, 2016). Para esta prueba las muestras resuspendidas en DMSO de grado analítico fueron inoculadas (10 µL) directamente sobre cultivos preparados en placas a manera de un césped de cultivo testigo, luego incubadas a 37°C por 24 h.

En el caso de los actinomicetos aislados de las esponjas marinas fueron seleccionados tres (3) cepas (MAR6-5A, MAR16-4C y MAR16-4E), los mismos que fueron procesados mediante procedimientos de extracción ya descritos líneas arriba, con la diferencia que el solvente orgánico utilizado en este caso fue tan sólo acetato de etilo, así como las cepas indicadoras fueron *S. aureus* MR y *Enterococcus* sp. Van R.

4.9.1. Prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en placas

Los extractos orgánicos obtenidos de cuatro cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de sedimentos (cepas I - 434A; I - 434B; MC 300 y M10 - 77) fueron re-suspendidos en 1 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) de grado analítico como solución madre, siguiendo la metodología recomendada por National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) basado en el método Kirby – Bauer. La evaluación antimicrobiana, se realizó utilizando métodos fenotípicos (dilución – difusión) (Pérez y Rivas, 2021) contra *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) y *E. faecalis* ATCC 29212 (VRE) preparados en Agar Muller Hinton. Sobre un césped de cultivo se prepararon pocillos (5 mm de diámetro) donde se colocaron 30 µL de las muestras de extractos orgánicos diluidos a diferentes concentraciones. Un disco de antibiótico de referencia (ciprofloxacina de 5,0 µg) se utilizó como control positivo y DMSO como control negativo. Finalmente, las placas de cultivo se incubaron a 37°C por 24 h y las lecturas se realizaron midiendo en mm el diámetro de los halos de inhibición. La CMI fue considerada como la mínima concentración (expresado en µg/mL) del extracto bioactivo que inhibe el crecimiento visible de una cepa bacteriana en las condiciones del ensayo.

4.9.2. Prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución

Se realizó en microplacas de Elisa según Wiegand *et al.* (2008), solo con algunas cepas seleccionadas de actinomicetos provenientes de sedimentos y esponjas. En el caso de

sedimentos se eligió a la cepa M10-77 (identificada como *Streptomyces erythrogriceus*) enfrentando a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MR) y *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (VR). Las cepas testigo fueron cultivadas en el medio Caldo Tripticasa Soya (TSB) e incubadas a 37 °C por 20 h hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. A partir de este cultivo se preparó una suspensión de cepa testigo a la concentración equivalente a 0,5 de escala Mc Farland. Una solución stock de 2 mg/ml del extracto diclorometánico de *Streptomyces erythrogriceus* M10-77 fue resuspendida en DMSO. En seguida, se prepararon diluciones 1:2 de suspensión, aplicando 10 µL a cada pocillo de la microplaca. A continuación, 80 µL del medio TSB fue vertido y mezclado con la suspensión de prueba; para luego agregar 10 µL de la suspensión bacteriana en cada pocillo. El material así preparado se incubó a 37 °C por 18 – 24 h. Transcurrido el tiempo se vertió 40 µL de 2, 3, 5 – Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC) en los pocillos para luego llevar nuevamente a incubación por 30 min. El viraje del medio a un color rojo fue definido como crecimiento microbiano. Se consideró como el valor de la CMI a la menor concentración en la que no hubo crecimiento. El solvente DMSO fue utilizado como control negativo; en tanto, Streptomina un antibiótico muy potente frente a bacterias Gram positivas fue utilizado como control positivo.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas de actinomicetos que fueron aislados de esponjas marinas (MAR6-5A, MAR16-4C y MAR16-4E) la prueba se realizó de manera similar según el método de la microdilución (Lee *et al.*, 2017). Para ello, una suspensión de cepas testigos (0,5 de la escala Mc Farland) se enfrentó con muestras del extracto diclorometánico resuspendido en DMSO y diluidas a concentraciones decrecientes. Se preparó las diluciones 1:2 y aplicadas en cada pocillo de la microplaca. La mezcla se incubó a 37 °C por 18 – 24 h, luego, transcurrido el tiempo se reveló con la adición de 2, 3, 5 – Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC). El DMSO fue utilizado como control negativo, en tanto el Imipenem (antibiótico comercial) se usó como control positivo. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.10. Identificación de actinomicetos seleccionados mediante secuenciación del RNAr 16S

Actinomicetos aislados tanto de sedimentos como de esponjas marinas y seleccionados por su mayor actividad antimicrobiano contra los patógenos MDR y cepas de *Candida albicans* (en el caso de sedimentos) fueron evaluados según Hentschel *et al.*, (2001).

Actinomicetos M10-77 y MC-300 cepas seleccionadas por producir metabolitos antimicrobianos de amplio espectro, fueron evaluados en una primera etapa para su

identificación filogenética a nivel de PCR. La amplificación del gen RNAr 16S se llevó a cabo usando Promega Taq y los primers universal 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GYTACCTTGTTACGACTT-3') por 30 ciclos. Los productos de PCR fueron sometidos a análisis BLAST por electroforesis en gel y las secuencias comparadas con la base de datos existentes en el GenBank. El árbol filogenético fue elaborado usando los algoritmos de Neighbour – Joining implementados en el programa ARB con porcentajes de similitud > a 99%. El proceso se llevó a cabo en el Whitaker Lab – Departament of Microbiology, University of Illinois.

En una segunda etapa, cinco cepas adicionales de sedimentos (M11-105, M11-116, B1T61, I-434B, I-300C), elegidas por su mayor actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas MDR y *Candida albicans*, fueron evaluadas para su identificación filogenética mediante pruebas de PCR. Las cepas fueron sembradas en Caldo Tripticasa Soya (TSB) e incubadas a 30° C durante 48 h en agitación (Hentschel *et al.* 2001). Al cabo de este tiempo, los cultivos fueron centrifugados a 12000 g por 5 min a 4°C, para luego obtener el DNA genómico utilizando un kit comercial de extracción y purificación (Wizard Genomics - Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU) según las instrucciones indicadas por el fabricante. Para la amplificación de secuencias de RNAr 16S y análisis filogenético se utilizó el método seguido por Song *et al.* (2004). Previa evaluación de la pureza del DNA genómico se amplificó el gen RNAr 16S mediante PCR con DNA polimerasa y empleando los cebadores universales 27f (5'AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'GGTTACCTTGTTA CGACTT-3') en un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Wood bridge, NJ, EE. UU.). Las condiciones térmicas del ciclo fueron como sigue: desnaturalización del ADN diana a 98°C durante 3 minutos seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 54°C durante 1 minuto y extensión primaria a 72°C durante 5 minutos y luego enfriado a 4°C. Los productos amplificados fueron detectados utilizando gel de electroforesis de agarosa y visualizados mediante fluorescencia UV después de teñir con bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se compararon con los genomas de la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la herramienta BLASTN (Altschul *et al.*, 1990). El árbol filogenético fue construido con el programa Mega versión 6 (Tamura *et al.* 2013) de acuerdo con el método estadístico Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), utilizando el modelo de sustitución de Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas. Las secuencias para la construcción del árbol filogenético fueron obtenidas de la base de datos del Ribosomal Database Project y National Center for Biotechnology. Para la comparación de secuencias,

Nocardia asteroides, *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* fueron los géneros elegidos por su relación cercana con *Streptomyces*; en tanto, *Bacillus subtilis* fue elegida especie externa del grupo. El proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Argentina.

En el caso de los actinomicetos MAR12-4A, MAR16-4E, MAR6-5B y MAR6-5A que fueron aislados de esponjas y seleccionados por su mayor actividad antimicrobiana frente a uropatógenos de origen clínico, las cepas seleccionadas se sembraron en caldo marino y se incubaron con agitación a 28 °C durante 7 días. Luego, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min, añadiendo al sedimento 1 ml de lisozima (20 mg/ml) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), manteniéndose en incubación a 56 °C durante 1 h. La extracción de ADN se realizó con el kit Gene JET Genomic (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido). La identificación molecular se realizó mediante amplificación por PCR del gen RNAr 16S utilizando los cebadores universales 27F y 1429R, cuyas secuencias son 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' respectivamente (Parada *et al.*, (2017). Los amplicones se revelaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1300 pb) y se enviaron a MacroGen Inc. (Corea) para su secuenciación. Los cromatogramas fueron evaluados y editados en el programa MEGA7, con múltiples secuencias de otros actinomicetos de la base de datos GenBank. El árbol filogenético se construyó utilizando el método Neighbor-Joining (Kumar *et al.*, 2016) con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas. Para la comparación de secuencias se utilizó *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *N. asteroides* y *R. equi* por su cercanía a *Streptomyces*, y *Bacillus subtilis* como miembro del grupo externo.

4.11. Crecimiento y actividad inhibitoria de actinomicetos en presencia y ausencia de agua de mar.

Los actinomicetos aislados del sedimento marino (n = 62) fueron procesados para determinar comparativamente la capacidad de crecimiento y producción de la sustancia inhibitoria en medios de cultivo conteniendo 3,5 y 0% de NaCl. Se prepararon medios de cultivo en placas con dos diluyentes, uno conteniendo el medio base (extracto de levadura, peptona de soya y agar) preparado con agua de mar natural (3,5% de NaCl) y otro preparado con los mismos componentes, pero utilizando agua desionizada (0% de NaCl) como diluyente.

A partir de un cultivo previamente reactivado, se sembraron simultáneamente en ambos medios de cultivo un volumen conocido (10 µL) de cada cepa de actinomiceto. Se dejó

adsorber por 30 minutos y luego se incubó a 28°C por 7 días. Las lecturas se realizaron midiendo el tamaño promedio (en mm) del diámetro de cada colonia. Para determinar la actividad antibiótica (porcentaje inhibitorio) se enfrentó a una cepa referencial de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (meticilino resistente) e incubando a 37°C por 24 h. El porcentaje inhibitorio de cada actinomiceto se determinó según lo señalado por Yuan and Crawford (1995).

4.12. Observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

Como complemento a la caracterización morfológica de los actinomicetos de origen marino se examinaron las estructuras finas de cepas seleccionadas mediante un análisis microscópico de alta resolución. Los actinomicetos seleccionados de ambas fuentes (sedimento y esponjas marinas) se examinaron microscópicamente por su morfología micelial y la cadena de esporas a 3000×, 5000×, 8000×, 10,000× y 12,000× de aumento. El análisis por microscopía electrónica de barrido permitió comprobar la disposición y estructura de las esporas y la morfología de su superficie externa.

Los actinomicetos fueron reactivados y cultivados en Agar Marino e incubados a 30 °C, durante siete días. Para su observación morfológica de actinomicetos se siguió la técnica de Prakash & Nawani (2014). Cubreobjetos limpios fueron cortados con un lápiz de diamante en cuatro secciones; éstas fueron esterilizadas y colocadas en un ángulo de 45° en el medio de crecimiento de actinomiceto de reciente sembrado. Fueron incubados por 3 a 5 días a 30°C. Al cabo del tiempo, las muestras (cubreobjetos) se retiraron para su preparación del estudio morfológico. Los cubreobjetos con el crecimiento fueron colocados sobre un soporte de aplicadores de madera, puestas dentro de una placa de Petri estéril en cuya base se colocó papel filtro. Se procedió a lavar las muestras usando una pipeta Pasteur, con la solución de tampón cacodilato al 0,1 M, conteniendo la misma, 10% de NaCl y 2% de $S_0_4Mg.7H_2O$. A continuación, las muestras fueron cubiertas con una solución de glutaraldehído 2,5%, diluido en la misma solución usada para el lavado. Posteriormente, las muestras fueron fijadas (3 h) y luego lavadas con la solución de sales; y en seguida deshidratadas en series de etanol del 70 al 100%, por 10 minutos en cada paso. Para la observación al microscopio electrónico de barrido, las muestras fueron procesadas en un equipo de desecado (critical point dry). En seguida, las muestras fueron colocadas en un portamuestras metálico especial para uso en el microscopio de barrido (stub) usando pintura de plata. Finalmente, las muestras fueron sombreadas con oro, en un "sputter" y luego examinadas en el Microscopio Electrónico de Barrido Inspect™ S50 (Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM).

4.13. Identificación de las esponjas

Las muestras de esponjas fueron identificadas a nivel de género mediante análisis de sus características morfológicas externas (color, forma, consistencia, ornamentación, ósculos y átrio), internas (sistema de canales), la observación del esqueleto (conformado por agregaciones minerales llamadas espículas) y la presencia de la proteína espongina (similar al colágeno), siguiendo el protocolo estandarizado por Córdor-Luján y Francia-Quiróz (2022).

4.14. Análisis de datos

Los datos recopilados en las diferentes pruebas de actividad antimicrobiana fueron considerados para un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de Duncan para determinar variaciones significativas ($p < 0,05$) en los índices de tratamientos experimentales y el tratamiento de los controles. Los datos se expresaron por índices estadísticos de las diferencias en comparación con los valores medios (media \pm SE). El análisis estadístico se efectuó utilizando la Versión 19.0 del software SPSS.

V. RESULTADOS

5.1. Enriquecimiento y aislamiento de actinomicetos de sedimento marino

Debido que las muestras de sedimento previos al aislamiento de actinomicetos fueron procesados siguiendo dos métodos (calor húmedo y calor seco), utilizando el método I (húmedo) y sembrados en Agar Czapeck se logró recuperar colonias de actinomicetos en el 50 % de placas totales sembradas; en cambio, de las muestras procesadas por el mismo método, pero sembradas en Agar Marino se llegó a recuperar hasta el 75 % de crecimiento de actinomicetos. En cambio, de las muestras tratadas por el método II o calor seco, luego que fueron sembradas en el Agar Czapeck solo crecieron en el 12 % de las placas, mientras que en el Agar Marino crecieron hasta en el 25% de placas sembradas.

Definitivamente, el pretratamiento de las muestras en calor húmedo fue eficaz para restar el crecimiento de la carga microbiana que acompaña al sedimento, ya que en la mayoría de los cultivos se obtuvo actinomicetos como colonias puras. En nuestro estudio, aplicando ambas metodologías se recuperó 62 cepas de actinomicetos marinos (Tabla 8), los cuales pasaron a formar parte del cepario y almacenados en refrigeración para estudios posteriores.

5.2. Características culturales de actinomicetos de sedimento marino

La Tabla 8 muestra las características de cultivo de las 62 cepas de actinomicetos aislados de sedimentos. En Agar Marino iniciaron su crecimiento luego de 5 a 7 días de incubación, prolongándose hasta 21 días. A la semana de incubación, las colonias presentaron tamaños variables; inicialmente pequeñas (1 a 2 mm de diámetro), luego con el transcurrir del tiempo (hasta 21 días) formaron colonias de tamaños mayores (hasta 12 mm de diámetro). La mayoría de las colonias (65 %) inicialmente presentaron consistencia húmeda, pero a los pocos días se tornaron opacas y secas con apariencia pulverulenta. Este comportamiento cultural es propio de los actinomicetos miceliales formadoras de esporas. Con el tiempo, se logró observar las superficies crateriforme y corrugada con anillos concéntricos de pigmentación variable (Figura 17, Figura 18).

Fue notoria la observación de colonias de diferentes colores y ornamentaciones. La mayoría presentó la forma circular, bordes irregulares (festoneados, dentados y dactiliformes). El color de las colonias fue variable; predominando las blancas sin pigmentación (37,1 %) seguida de grisáceas (29,03 %); además, pigmentaciones como blanco-rosáceas (16,12 %), cremas (12,9 %) y blanco-amarillentas (4,83 %) (Figura 16).

Tabla 8. Características culturales de actinomicetos (n=62) de sedimento marino.

CEPAS (Código)	Crecimiento (Medio)		COLONIA		Pigmento difusible	Género	Origen (Bahía)
	Agar Marino	Agar Czapeck	Micelio aéreo (color)	Reverso colonia (color)			
I-34A	++	++	Blanco.	Marrón tenue	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-34B	++	++	Grisáceo.	Marrón tenue.	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-234	+++	++	Marrón	Marrón	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-334A	+++	++	Blanco-grisáceo.	Marrón claro.	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-334B	++	+	Blanco-rojizo.	Rojizo.	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-434A	++	++	Grisáceo.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-434B	+++	++	Blanco-yesoso.	Marrón tenue	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-100A	+++	++	Blanco-yesoso.	Plomizo	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-100B	+++	++	Blanco-grisáceo.	Marrón	naranja	<i>Streptomyces</i>	A
I-300A	++	++	Grisáceo.	Marrón tenue.	naranja	<i>Streptomyces</i>	A
I-300B	+++	+++	Marrón -claro	Marrón	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-300C	+++	++	Grisáceo	Marrón tenue	Marrón	<i>Streptomyces</i>	A
MC-300	+++	++	Grisáceo.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-400A	++	++	Blanco-grisáceo.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-400B	+++	+++	Blanco-yesoso.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	A
I-400C	+++	++	Grisáceo.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	A
M10-77	+++	++	Grisáceo	Marrón oscuro.	-	<i>Streptomyces</i>	I
M10-85	+++	++	Blanco.	blanco grisáceo	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-105	+++	++	Blanco	Amarillo tenue	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-106	+++	++	Blanco-yesoso	marrón tenue	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-110	+++	++	Blanco-rojizo.	Rojizo	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-108	++	+	Blanco-yesoso	marrón tenue.	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-118	+++	++	Blanco-grisáceo.	grisáceo	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-103	+++	+++	Blanco-yesoso	Blanco-grisáceo	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-116	++	++	Blanquecino	Marrón oscuro	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-121	+++	++	Blanco grisáceo	Amarillo tenue	amarillo	<i>Streptomyces</i>	I
M11-125	++	+	Blanco-amarillento	Anaranjad. claro.	amarillo	<i>Streptomyces</i>	I
M11-131	++	+	Blanco-yesoso	Amarillo	-	<i>Streptomyces</i>	I
M11-133	+++	++	Blanco.	Beige -rojizo	Rojizo	<i>Streptomyces</i>	I
M12-141	++	++	Blanco- rosáceo	Rosáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	I
EM-2005	+++	+++	Blanco.	Marrón tenue	-	<i>Streptomyces</i>	I
AC-16	+++	++	Blanco-rojizo	Ligeram. rojizo.	-	<i>Streptomyces</i>	I
II-234C	+++	++	Blanco- yesoso.	Marrón - verde.	Verde	<i>Streptomyces</i>	I
II-300A	++	++	Blanco-yesoso.	Plomizo	-	<i>Streptomyces</i>	I
II-300B	+++	+++	Crema.	Crema.	-	<i>Streptomyces</i>	I
II-334A	+++	+++	Blanco-yesoso	Marrón tenue.	-	<i>Streptomyces</i>	I
II-334B	+++	++	Gris oscuro.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	I
II-334C	+++	++	Grisáceo.	Plomizo	-	<i>Streptomyces</i>	I
II-400A	+++	++	Blanco-yesoso.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	I
II-400B	++	++	Blanco-yesoso.	Crema.	-	<i>Streptomyces</i>	I
II-534	++	++	Blanco-amarillo.	Guinda oscura.	Guinda	<i>Streptomyces</i>	I
III-200A	++	++	Blanco – yesoso.	Verde amarillo.	Verde	<i>Streptomyces</i>	I
III-200B	+++	+++	Blanco – yesoso.	Marrón.	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-200C	+++	++	Blanco – yesoso.	Marrón verdoso	Verde tenue	<i>Streptomyces</i>	I
III-200D	++	+	Crema - yesoso.	Marrón claro.	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-200E	++	++	Blanco – yesoso	Blanco-rosáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-200F	++	+	Crema – yesoso.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-200G	+++	++	Plomizo.	Blanco-crema.	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-234A	+++	+++	Crema.	Beige	Rojizo	<i>Streptomyces</i>	I
III-234B	++	++	Blanco-yesoso.	Marrón claro	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-234D	+++	++	Blanco-yesoso.	Amarillento.	Amarillo	<i>Streptomyces</i>	I
III-234E	++	+	Blanco–marrón.	Beige - rojo.	Rojizo	<i>Streptomyces</i>	I
III-300A	++	++	Blanco – yesoso.	Marrón rojizo.	Rojizo	<i>Streptomyces</i>	I
III-300C	+++	+++	Blanco – grisáceo.	Marrón rojizo.	Rojizo	<i>Streptomyces</i>	I
III-400A	+++	++	Blanco – yesoso.	Marrón rojizo.	Rojizo	<i>Streptomyces</i>	I
III-400B	+++	+++	Crema - rojizo	Rosáceo	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-434A	++	++	Blanco – yesoso.	Blanco – gris	Marrón	<i>Streptomyces</i>	I
III-434B	+++	++	Plomizo.	Plomizo	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-434C	+++	++	Blanco – yesoso.	Grisáceo	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-434D	++	+	Blanco – yesoso.	Grisáceo.	-	<i>Streptomyces</i>	I
III-434E	+++	++	Blanco – yesoso.	Marrón.	-	<i>Streptomyces</i>	I
B1T61	+++	+++	Blanco – yesoso.	Marrón.	-	<i>Streptomyces</i>	I

Crecimiento de colonias: +: bajo; ++: moderado; +++: alto. **A:** frente a Ancón (Lima); **I:** Bahía de Independencia (Ica)

Un aspecto complementario a las características de las colonias de actinomicetos marinos está referido a la producción del pigmento extracelular o difusible al medio. Se pudo observar colonias que liberan pigmentación que varía desde marrón oscuro, rojizo, rosáceo hasta amarillo pálido (Tabla 8). Con frecuencia se observó colonias grisáceas con puntos blancos en la parte central, así como colonias con exudados. Tardíamente, algunas colonias llegan a formar anillos concéntricos; al parecer, sería una respuesta quimiotrófica inducida por el gradiente de nutrientes en el medio y la temperatura de incubación, ya que fue posible observar mejor este comportamiento en las colonias mantenidas en refrigeración.

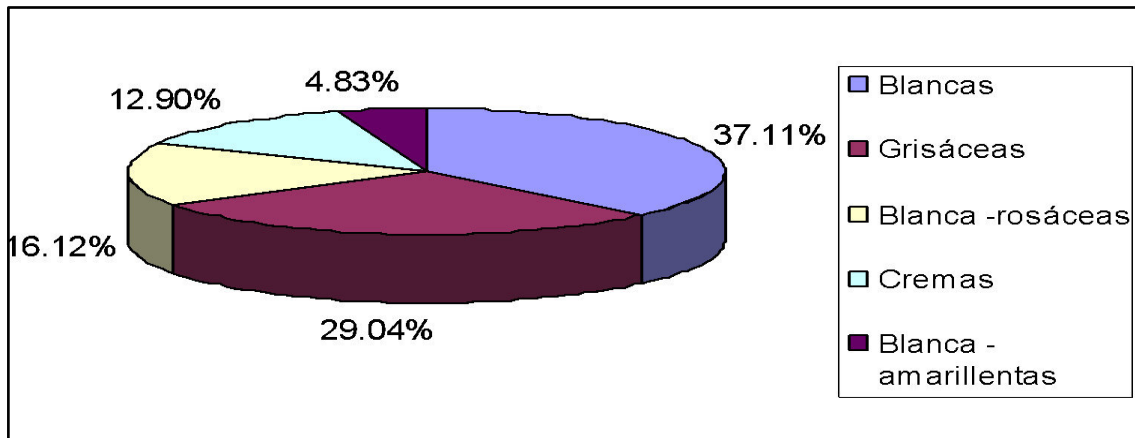


Figura 16. Pigmentación de colonias de actinomicetos aislados de sedimento marino colectado frente a Ancón (Lima) y bahía de Independencia (Ica).

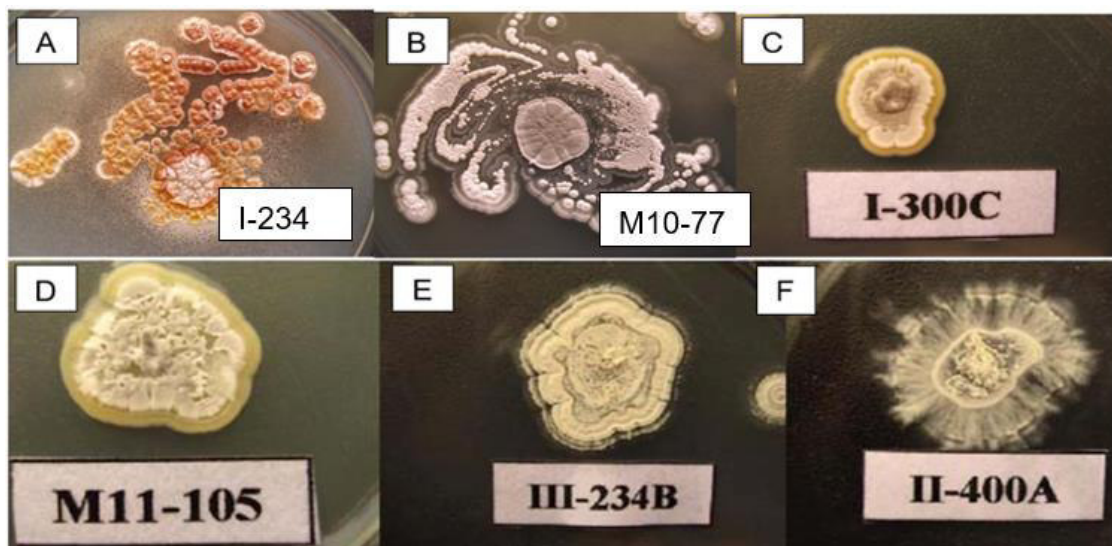


Figura 17. Diversidad de colonias de actinomicetos aislados de sedimento marino de la costa central del Perú (Bahías de Ancón e Independencia).

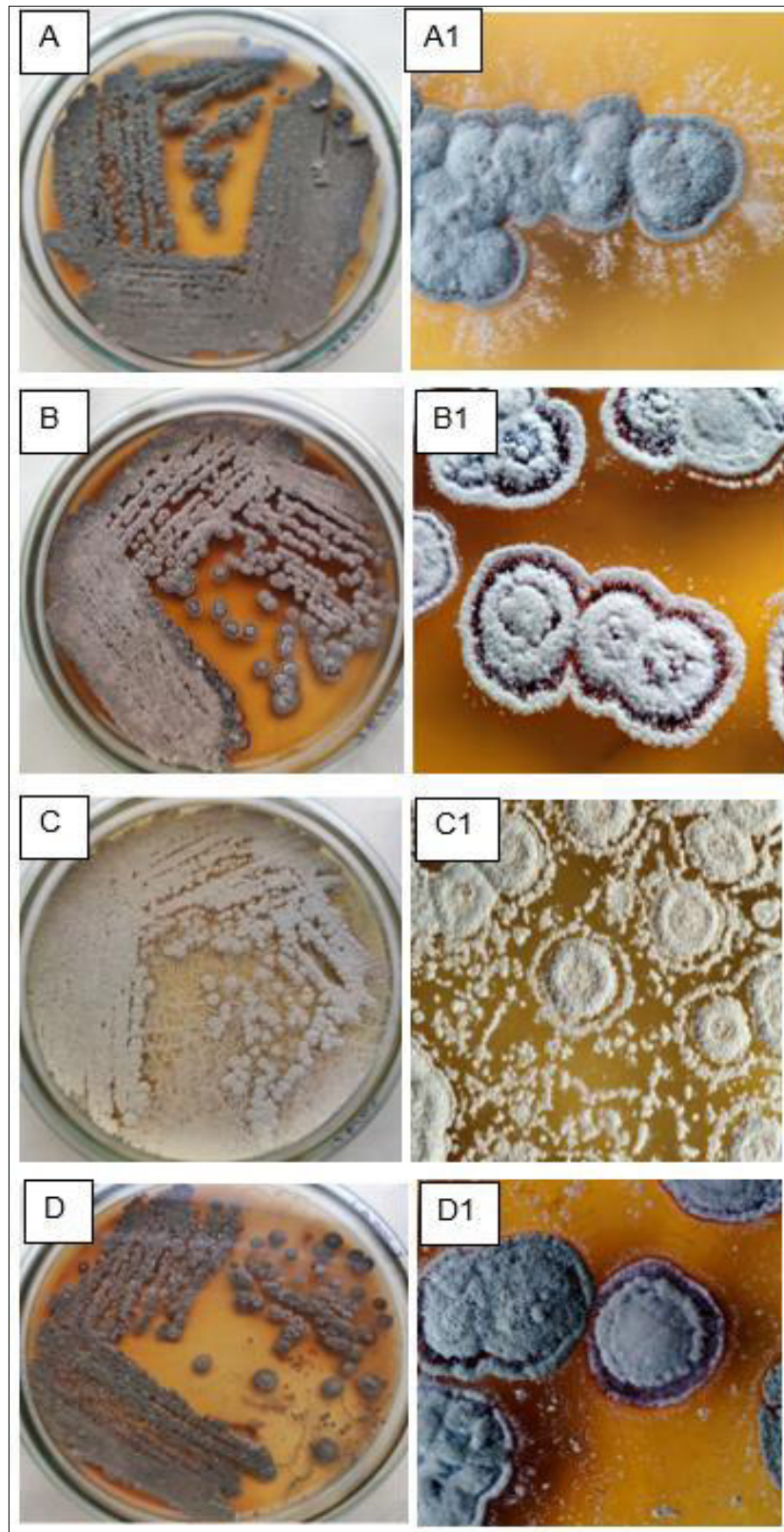


Figura 18. Colonias de actinomicetos de sedimento marino en Agar Starch M Protein (no descrito en el presente trabajo), identificadas como *Streptomyces* sp. M11-116 (**A, A1**), *Streptomyces* sp. MC-300 (**B, B1**), *Streptomyces* sp. M11-106 (**C, C1**) y *Streptomyces erythrogriseus* M10-77 (**D, D1**).

Las observaciones convencionales al microscopio óptico permitieron distinguir las estructuras filamentosas con ramificaciones, que al ser coloreadas por el método Gram se mostraron todas como Gram positivas. Por otro lado, en los cultivos líquidos sin agitación la mayoría de los actinomicetos crecieron formando una densa capa de micelios en la superficie a manera de una película gruesa; pero en otros casos, el desarrollo ocurrió con fuerte adherencia a las paredes del tubo.

En los cultivos líquidos sometidos a agitación, el crecimiento de los actinomicetos fue distinto en relación con los cultivos estáticos. Al cabo de 5 a 7 días de incubación crecieron inicialmente formando pequeños conglomerados de micelio en suspensión, luego, tardíamente formaron bloques de mayor tamaño que precipitaron a manera de colonias algodonosas.

Otra característica de los cultivos de actinomicetos es el olor a “tierra húmeda” por producción de geosmina (descrita ampliamente como característica de actinomicetos de origen terrestre). En este sentido, en los actinomicetos marinos se logró percibir de manera indistinta ya sea en el medio líquido o sólido. Al parecer, la producción de geosmina varía en función del tiempo de crecimiento de los actinomicetos provenientes de sedimentos marinos.

Los resultados de los microcultivos de los actinomicetos señalaron que el método practicado como “bloque de agar” fue más eficaz que el método de “laminilla en plano inclinado”, ya que permitió observar mejor las estructuras vegetativas, así como las de fructificación (esporas) de los actinomicetos en estudio (Figura 19).

Por otro lado, las observaciones de microscopía óptica (Gram y coloración con Azul de Lactofenol) y electrónica de barrido permitieron distinguir estructuras miceliales de los actinomicetos marinos y aspectos morfológicos de sus esporas. Asimismo, con ambos procedimientos, pero sobre todo con la microscopía electrónica se pudo observar con mayor detalle aspectos morfológicos finos de las estructuras tanto vegetativas (micelial), así como reproductivas (esporas), sus arreglos y tamaños (Figura 19, Figura 20). De acuerdo con los resultados obtenidos por su evaluación morfológica macroscópica y microscópica y confrontados con la guía de identificación de Actinomicetos según el esquema de Holt *et al.* (1994) los aislados fueron considerados como miembros del género *Streptomyces*.

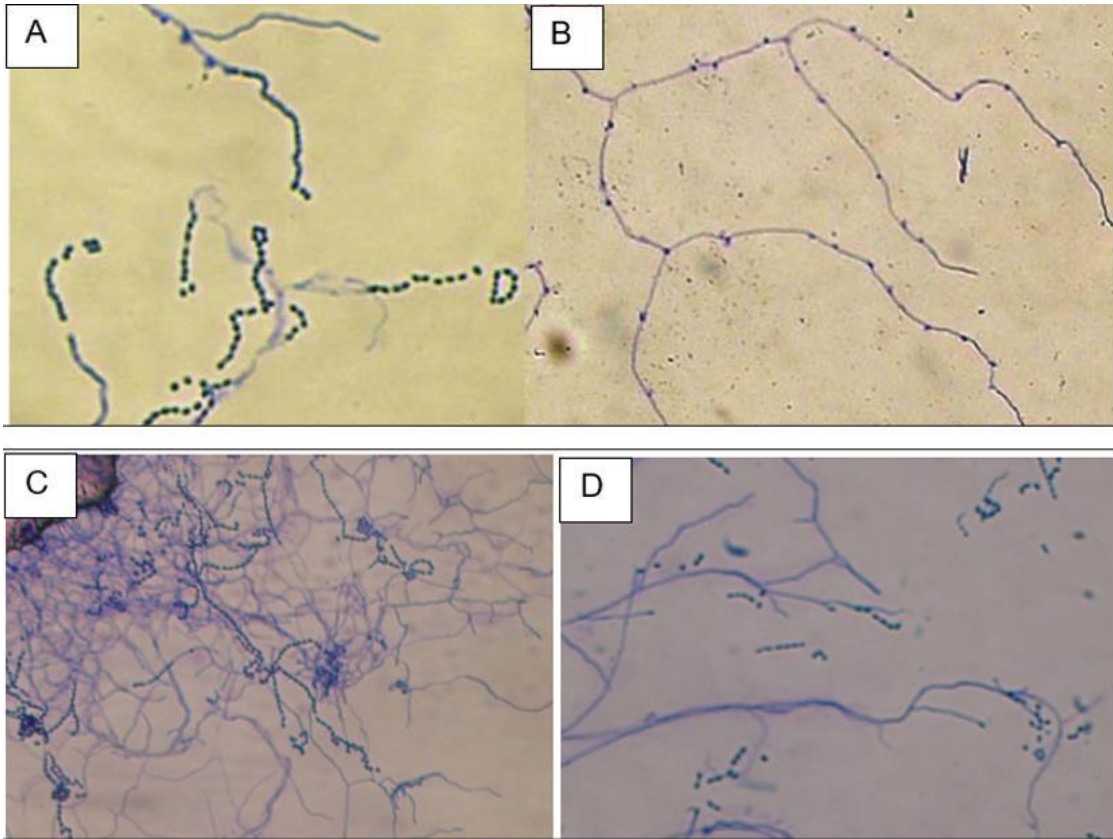


Figura 19. Observación microscópica (coloración Gram) de la estructura filamentososa de los micelios y cadena de esporas de actinomicetos marinos. **A:** cepa M10-77; **B:** M11-120; **C:** II-300B; **D:** III-434B, identificados como *Streptomyces* sp. Aumento: 1000X.

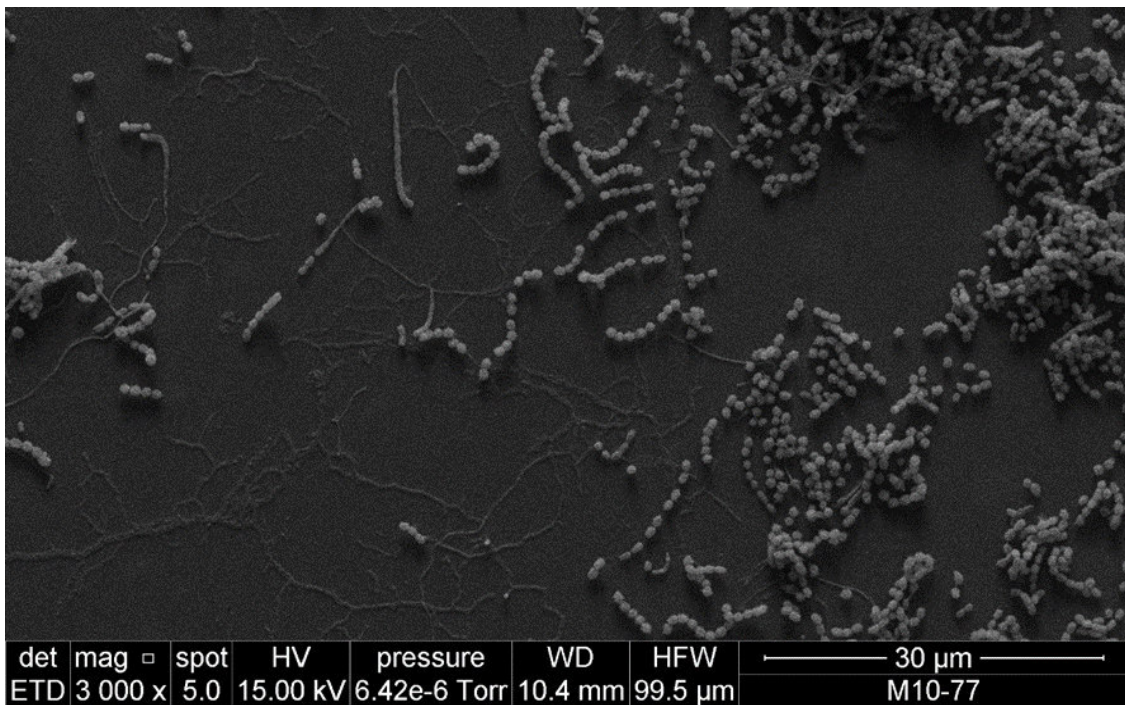


Figura 20. Microfotografía de la cadena de esporas del actinomiceto cepa M10-77, aislada de sedimento colectado a 34 m de profundidad en la Bahía de la Independencia (Paracas – Ica). Aumento: 3000x.

5.3. Perfil de resistencia antibiótica de cepas patógenas indicadoras de la actividad inhibitoria de actinomicetos.

Habiendo realizado las pruebas de antibiograma para las cepas de bacterias indicadoras de origen clínico se determinó que tanto las Gram positivas como las Gram negativas efectivamente son multidrogoresistentes (MDR). Los resultados se señalan en las Tablas 9, 10 y 11. De un total de 8 antibióticos aplicados a *Pseudomonas aeruginosa* cepa 657 se observó la resistencia a 5 de ellos; mientras que *Staphylococcus aureus* cepa 457 de un total de 10 antibióticos ofreció resistencia a 8 antibióticos (Tabla 9). Asimismo, esta multirresistencia se puede apreciar en la Figura 21. Las cepas patógenas tanto Gram positivas como Gram negativas proporcionadas por el Hospital Casimiro Ulloa resultaron ser mayores drogorresistentes, destacando entre los Gram negativos *Klebsiella* spp cepa 184 aislada de una secreción bronquial. Asimismo, las especies de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. aerogenes* y *Acinetobacter* presentaron multirresistencia (Tabla 10). Entre los Gram positivos es destacable la multirresistencia ofrecida por la cepa *Staphylococcus coagulasa* negativa 348 proveniente de secreción vaginal (Tabla 11). Cabe recalcar que la resistencia de los patógenos se mostró frente a una gama de antibióticos de última generación. Por otro lado, cabe señalar que todos los patógenos resultaron ser sensibles a Amikacina (30 µg).

Tabla 9. Perfil de resistencia antibiótica de dos cepas patógenas MDR (*), utilizados como testigos en las pruebas de actividad antimicrobiana de los actinomicetos.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
Área: Cardiología			Área: Medicina interna		
Código de la muestra: 657			Código de la muestra: 457		
Tipo de muestra: Aspirado traqueal			Tipo de muestra: Aspirado de catéter		
Antibiótico	(**)	Halo inhib. (mm)	Antibiótico	(**)	Halo inhib. (mm)
Carbenicilina	R	6	Penicilina	R	6
Imipenem	R	11	Oxacilina	R	6
Amicacina	S	18	Gentamicina	R	6
Ciprofloxacina	S	26	Eritromicina	R	6
Ceftazidina	R	6	Tetraciclina	S	25
Aztreonam	I	17	Cloramfenicol	R	6
Gentamicina	R	6	Clindamicina	R	6
Meropenem	R	6	Rifampicina	S	31
			Sulfamet+Trime	R	6
			Ciprofloxacina	R	6

(*) donación del Instituto Especializado del Niño, Lima – Perú. (**) R: resistente; S: sensible; I: intermedio

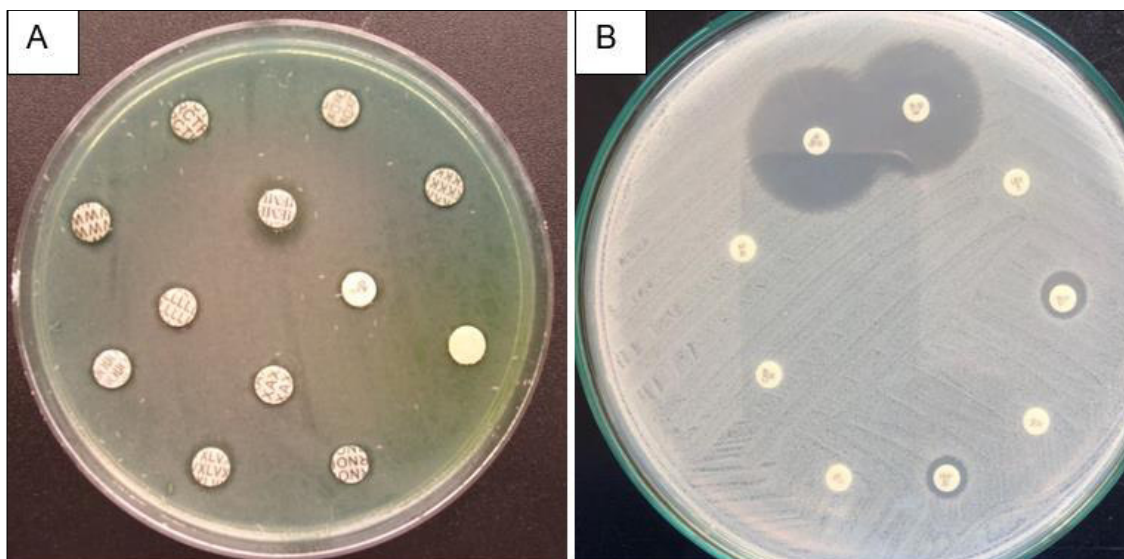


Figura 21. Perfil de resistencia antibiótica mostrada por dos cepas MDR, *Pseudomonas aeruginosa* (A) y *Staphylococcus aureus* (B).

Tabla 10. Perfil de resistencia antibiótica de patógenos MDR Gram negativos (Proporcionados por el Hospital Casimiro Ulloa).

Patógenos multidrogorresistentes (MDR)						
	<i>P. aeruginosa</i> 149	<i>P. aeruginosa</i> 303	<i>E. coli</i> 302	<i>E. aerogenes</i> 171	<i>Acinetobacter</i> spp. 134	<i>Klebsiella</i> spp. 184
Procedencia	Secreción endotraqueal	Aspirado traqueal	Secrec. herida	Secreción faríngea	Secreción bronquial	Secreción bronquial
Antibióticos						
Amikacina (30µg)	S	S	S	S	S	S
Amoxicilina (25µg)		R	R			R
Ampicilina + sulbactam (10/10µg)	R	R	R	R	R	R
Aztreonam (30µg)	S	S	R	R	R	R
Cefalexina (30µg)	R	S	S	R	R	
Cefepime (30µg)	S	S	R	S	R	R
Ceftazidima (30µg)	S	R	R	R	R	R
Cefuroxima (30µg)	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacino (5µg)	R	R	R	R	S	R
Cloranfenicol (30µg)	R	S	S	S	S	R
Meropenem (10µg)	R	R	S	S	R	S
Trimetropin + Sulfametoxazol (25µg)	R	R	R	R	S	R
Tetraciclina (30 µg)	R			R	R	R

R: resistente; S: sensible

Tabla 11. Perfil de resistencia antibiótica de patógenos MDR Gram positivos (proporcionados por el Hospital Casimiro Ulloa) utilizados como cepas testigo en las pruebas de actividad antimicrobiana de los actinomicetos.

Antibióticos	<i>Enterococcus</i> <i>spp.</i> 239	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> 1094	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> 1093	<i>Staphylococcus</i> <i>coagulasa</i> (-) 348
	Orina	Secreción bronquial	Orina	Secreción vaginal
Ácido nalidíxico (30 µg)	R			
Amikacina (30 µg)	S	I	S	S
Amoxicilina (25 µg)	S		R	
Amoxicilina + clavulanato (30 µg)				R
Ampicilina + sulbactam (10/10 µg)	S			
Bacitracina (10 µg)	R			
Cefalotina (30 µg)	R	S	S	
Cefepime (30 µg)		R		S
Ceftazidima (30 µg)	R	R		R
Ceftriaxona (30 µg)			R	
Cefuroxima (30 µg)	R	I	S	R
Ciprofloxacino (5 µg)	R	R		R
Claritromicina (15 µg)		R	R	
Dicloxacilina (1 µg)				R
Eritromicina (15 µg)	R			R
Gentamicina (10 µg)		S	R	
Levofloxacina (5 µg)				R
Meropenem (10 µg)		I		R
Nitrofurantoína (300 µg)	S		S	
Norfloxacino (10 µg)			R	
Optoquina (5 µg)	R			
Trimetropin + Sulfametoxazol (25 µg)			R	R
Vancomicina (30 µg)		S		S

R: resistente; S: sensible; I: intermedio

5.4. Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de sedimento marino

5.4.1. Tamizaje preliminar de actividad antibacteriana

Del total de 62 actinomicetos marinos (Tabla 8) aislados de sedimento marino y evaluados por su actividad antibacteriana en el tamizaje primario se logró determinar 31 cepas (50 %) con actividad antibacteriana a *S. aureus* 457, 36 (59 %) frente a *P. aeruginosa* 657 y 23 (37 %) a ambos patógenos (Tabla 12). Cabe recalcar que dichos patógenos son de origen clínico y han sido previamente evaluados por su carácter MDR a los principales antibióticos de uso convencional. Los actinomicetos M10-77 e I-400A fueron quienes exhibieron mayor actividad inhibitoria en las pruebas de antagonismo *in vitro* en especial frente a *S. aureus* 457 (Figura 22) y *P. aeruginosa* 657 (Figura 25).

Tabla 12. Actividad inhibitoria de actinomicetos marinos (n=62) frente a dos bacterias MDR y *Candida albicans* de origen clínico.

Actinomicetos	<i>S. aureus</i> 457	<i>P. aeruginosa</i> 657	<i>C. albicans</i> 1511	<i>C. albicans</i> 1511 MIC
M10-77	++++	+	+	+
M10-85	++	+	+	+
M11-105	+++	-	-	-
M11-106	+	+	-	-
M11-110	+	-	-	-
M11-115	-	+	-	-
M11-116	+++	+	-	-
M11-120	+	+	++	-
M11-121	++	-	-	-
M11-123	-	-	-	-
M11-125	-	+	+	+
M11-131	-	-	-	-
M11-133	-	+	-	-
EM-2005	-	+	-	-
M12-141	+	+	++	-
MC-300	+	+	+	+
AC16	+	-	-	-
I-34A	+	+	-	-
I-100A	+	+	-	-
I-100B	-	-	-	-
I-34B	+	+	+	-
I-234	+	+	-	+
I-300A	++	+	+	+
I-300C	++	+	+	+
I-334A	-	+	-	-
I-334B	-	-	-	-
I-434A	++	+	+	+
I-434B	+++	+	+	+
I-400A	+	+	+	+
I-400B	+	+	+	+
I-400C	-	+	-	-
I-534	-	-	-	-
II-300A	-	+	-	-
II-300B	-	+	-	-
II-334A	-	-	+	+
II-334B	+	+	+	+
II-334C	+	+	+	+
II-400A	-	+	-	-
II-400B	-	-	-	-
II-534	-	-	-	-
III-200A	-	-	-	-
III-200B	-	+	-	-
III-200C	-	-	-	-
III-200D	+	-	-	-
III-200E	-	-	-	-
III-200F	+	-	-	-
III-200G	-	-	-	-
III-234A	-	+	-	-
III-234B	-	+	-	-
III-234C	+	+	-	-
III-234D	+	-	-	-
III-234E	+	+	-	-
III-300A	++	+	-	-
III-300B	+	+	-	-
III-400A	+	-	-	-
III-400B	-	-	-	-
III-434A	-	-	-	-
III-434B	+	+	+	-
III-434C	-	-	-	-
III-434D	-	+	-	-
III-434E	-	-	-	-
B1T61	+++	+	++	-

Halos de inhibición (mm de diámetro):

0 <->, 1-10<+>, 11-20 <+++>, 21-30<++++>, 30 a más <++++>

5.4.2. Tamizaje de actividad antibacteriana frente a cepas estándar MDR.

Respecto a la actividad antimicrobiana de los actinomicetos frente a las cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MR), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (VR) y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (VS) los resultados son aún mucho más contundentes que en el caso anterior. Tal como se puede apreciar en la Tabla 13 y Figuras 23, 24 y 25 el tamaño de los halos de inhibición varió entre 11 a 78 mm de diámetro, siendo las cepas M11-121, M11-116 y M10-77 las más efectivas con 92, 85,7 y 85,2 % de inhibición respectivamente frente a *S. aureus* ATCC 43300 (MR) (Figura 23). En este estudio se incorporó a las pruebas de tamizaje una cepa peruana patógena MDR de *Staphylococcus aureus*, cuya sensibilidad frente a los actinomicetos se observa en la Figura 22 B y los porcentajes de inhibición oscilan entre 51,2 a 85,5 % (Tabla 13). En general, las cepas estándar Gram positivas mostraron mayor sensibilidad a la actividad inhibitoria de los actinomicetos.

Tabla 13. Actividad antimicrobiana (expresado en mm de diámetro de halos de inhibición) y porcentajes (%) de inhibición (*) de actinomicetos de sedimento marino frente a cepas estándar de *S. aureus*, *E. faecalis* y una cepa peruana de *S. aureus* MDR.

CEPAS (n=23)	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	% inhibición	<i>S. aureus</i> MDR (cepa peruana)	% inhibición	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	% inhibición	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	% inhibición
M10-77	61	85.2	66	83.3	-	-	55	69.1
M10-85	16	50	-	-	26	53.8	-	-
M11-105	62	82.2	64	75.9	54	82,8	58	74.1
M11-106	25	28	41	51.2	25	36	41	56.1
M11-116	77	85.7	30	60	61	85.2	70	84.3
M11-121	50	82	-	-	60	88.3	43	88.4
MC- 300	70	-	76	82.9	65	78.5	61	85.2
I-100A	12	25	15	53.3	-	-	-	-
I-234	60	81.6	69	82.6	50	72	55	76.4
I-300A	-	-	-	-	12	41.7	-	78.2
I-300B	62	79	60	81.7	52	76.9	53	75.5
I-300C	72	81.1	64	78.1	-	-	55	78.2
I-34 A	64	81.3	62	67.7	50	80	-	-
I-34 B	16	68.8	21	66.6	32	56.3	26	69.2
I-400A	69	84.1	75	81.3	-	-	-	-
I-434A	67	80.6	71	85.9	-	-	66	83.3
I-434B	61	-	65	84.6	56	76.8	55	76.4
II-334C	69	82.6	67	83.6	-	-	63	79.4
III-200D	11	18.2	-	-	-	-	-	-
III-234B	-	-	60	83.3	-	-	-	-
III-234E	-	-	-	-	78	80.8	-	-
III-434B	63	82.5	62	85.5	57	84.2	58	81
B1T61	62	79	68	83.8	48	79.2	66	83.3

(*) se resaltan en negrita los mayores halos de inhibición y en rojo los mayores porcentajes de inhibición.

Asimismo, la Tabla 13 y la Figura 26 muestran que la cepa M11-121 exhibe el mayor porcentaje inhibitoria frente a estos patógenos, siendo 92 % frente a *S. aureus* ATCC 43300, 88,3 % a *E. faecalis* ATCC 51299 y 88,4 % a *E. faecalis* ATCC 29212. Asimismo, la cepa M11-116 mostró porcentajes de inhibición de 85,5 % frente a *S. aureus* ATCC 43300, 85,2 % a *E. faecalis* ATCC 51299 y la cepa M10-77 que mostró inhibición de 85,2 % frente a *S. aureus* ATCC 43300. También es destacable la actividad de las cepas III-434A, III-434B y B1T6-1 por presentar porcentajes de inhibición de 85,5, 85,4 y 83,8 % respectivamente frente a *S. aureus* MDR (cepa peruana). Cabe señalar que *S. aureus* ATCC 43300 es MR, *E. faecalis* ATCC 51299 VR y *E. faecalis* ATCC 29212 es VS.

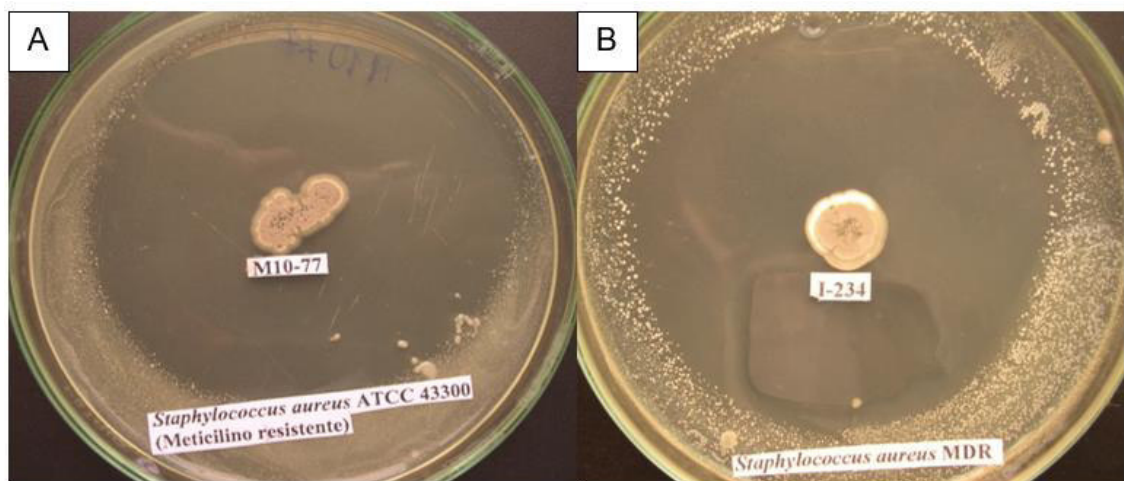


Figura 22. Actividad antimicrobiana de dos actinomicetos marinos frente a cepas MDR de *Staphylococcus aureus*. Cepa estándar (A) y cepa peruana (B).

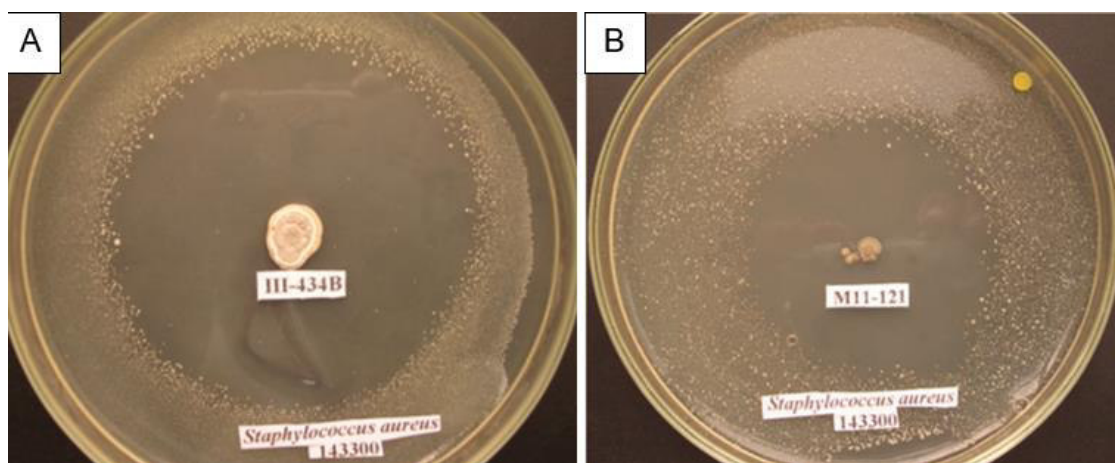


Figura 23. Actividad antimicrobiana de dos actinomicetos de sedimento marino frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 143300 drogorresistente.

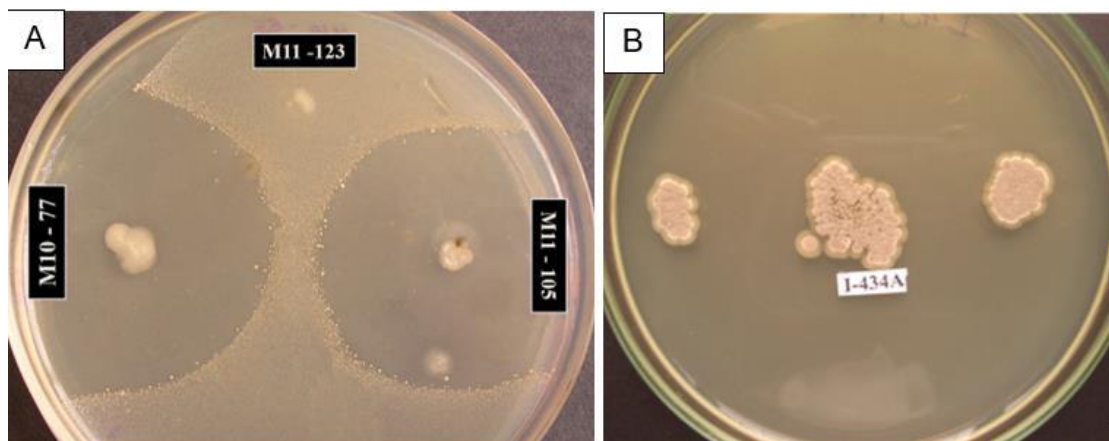


Figura 24. Actividad antimicrobiana de dos cultivos de actinomicetos frente a *Staphylococcus aureus* 1094 (A) y de tres cultivos frente a *Enterococcus* sp. 239 (B). En esta última la inhibición es total que no permitió el crecimiento del patógeno.

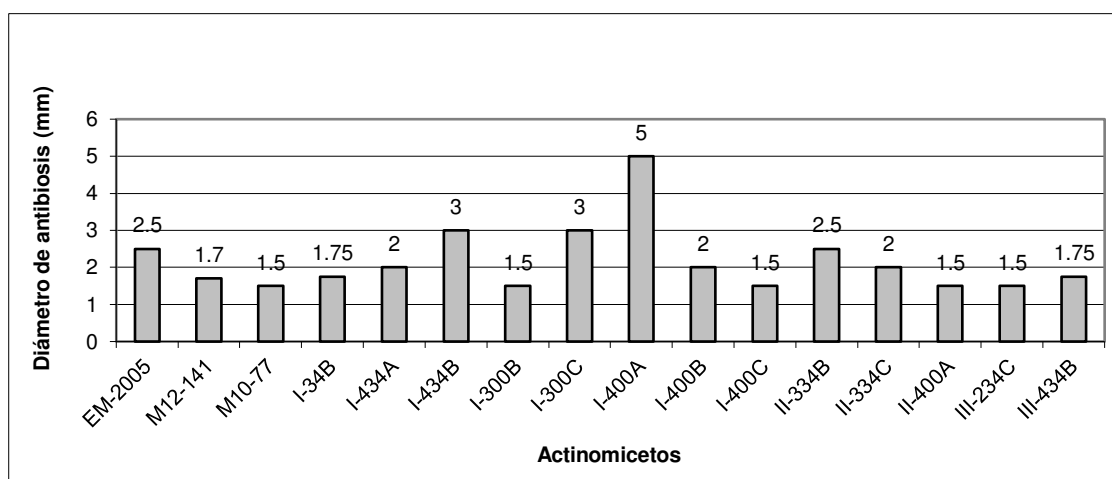


Figura 25. Actividad antibacteriana de actinomicetos marinos (n=16) frente a una cepa peruana de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 657 (MDR).

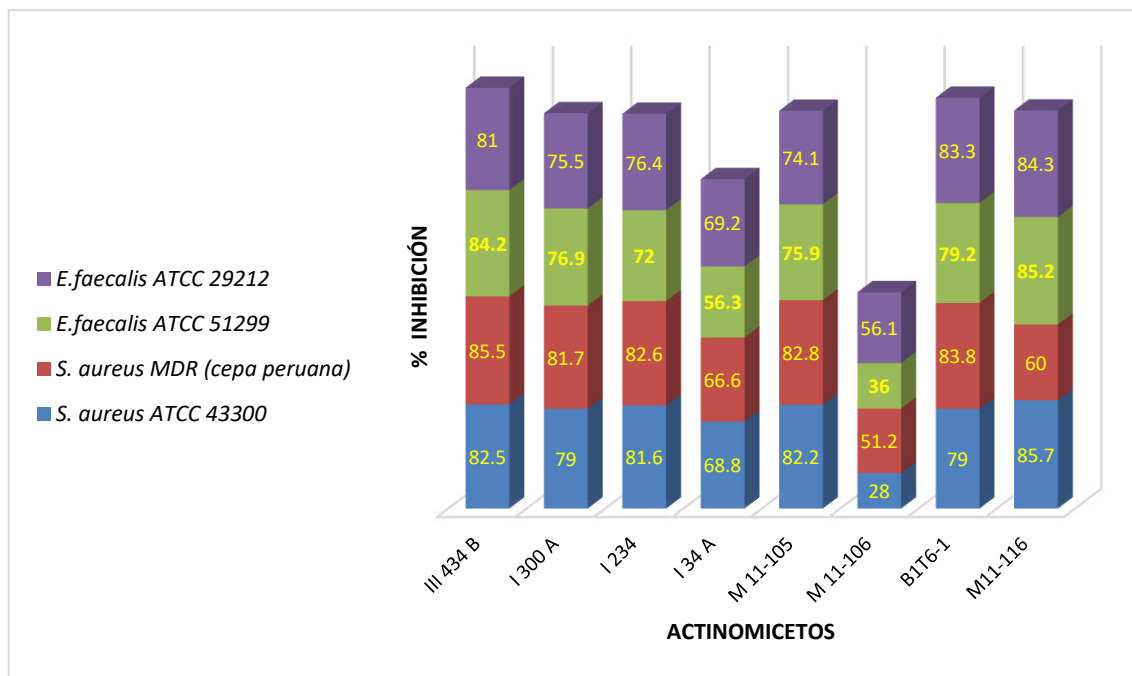


Figura 26. Cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de sedimentos y su actividad antimicrobiana expresados en % de inhibición frente a indicadores patógenos MDR.

5.4.3. Tamizaje de actividad antibacteriana a patógenos MDR Gram negativos

El comportamiento antimicrobiano de un grupo selecto de actinomicetos de sedimentos frente a patógenos MDR Gramnegativos de origen clínico se muestra en la Tablas 14. De un total de 18 aislados de actinomicetos previamente seleccionados y evaluados por su respuesta antimicrobiana frente a 6 cepas MDR Gramnegativas, la mayoría ha respondido favorablemente para inhibir a estos patógenos de origen hospitalario.

Pseudomonas aeruginosa 303 (un patógeno aislado del aspirado traqueal de un paciente y drogorresistente a 7 antibióticos de uso convencional en la terapia clínica (Tabla 9) se mostró como la cepa más sensible a la acción inhibitoria de los actinomicetos, siendo la cepa signada como MC-300 una de las más efectivas por su actividad que logró presentar halos inhibitorios que alcanza hasta 37 mm de diámetro. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con el patógeno MDR *Klebsiella* sp 184 (aislado de secreción bronquial de un paciente neumónico). En este caso, la actividad inhibitoria de los actinomicetos fue muy discreta, pues fue solamente sensible frente a dos de ellas (I-400 A y M11-116) (Tabla 14, Figura 27). Otro patógeno que mostró cierta resistencia fue *Escherichia coli* 302 (aislado de secreción de herida y resistente a 8 antibióticos), sin embargo, frente a M10-77 se mostró sensible, aunque el porcentaje inhibitorio (31,5%) fue discreto. En el caso de *E. aerogenes* 171 (aislado de secreción faríngea y resistente a 8 antibióticos de un total de 14) mostró sensibilidad moderada a 12

actinomicetos de un total de 18 evaluados, siendo la cepa M10-77 el mejor antagonista con 42,11 % de porcentaje de inhibición. Otro drogorresistente antagonizado por los actinomicetos de sedimento marino fue *Acinetobacter* 134 (aislado de secreción bronquial y resistente a 10 antibióticos de un total de 14), cuyo resultado se muestra en la Tabla 14. Cabe señalar que, en este caso, la actividad inhibitoria fue moderada a pesar de que, resulta siendo sensible frente a 11 cepas de un total de 18 evaluados, siendo 38,89 % el mayor porcentaje de inhibición mostrado en este caso frente a la cepa III-300A. Asimismo, la Tabla 14 indica los halos de inhibición que oscilan entre 13 a 37 mm para las dos cepas de *Pseudomonas* evaluadas. Otros patógenos MDR que mostraron alta sensibilidad fueron *Enterobacter aerogenes* 171 y *Acinetobacter* 134, siendo inhibidas por 12 y 11 de actinomicetos respectivamente de un total de 18 evaluados (Figura 27).

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de cepas seleccionadas de actinomicetos (aislados de sedimento marino) frente a patógenos Gram negativos MDR de origen clínico.

CEPAS (n=18)	<i>P. aeruginosa</i> 149		<i>P. aeruginosa</i> 303		<i>E. coli</i> 302		<i>E. aerogenes</i> 171		<i>Acinetobacter</i> 134		<i>Klebsiella</i> 184	
	Halo (*) (mm)	% Inhib	Halo (mm)	% (**) inhib	Halo (mm)	% Inhib	Halo (mm)	% Inhib	Halo (mm)	% Inhib	Halo (mm)	% Inhib
M10-77	0	0	34	58,82	19	31,58	19	42,11	19	36,84	0	0
M10-85	0	0	19	36,84	0	0	0	0	11	31,82	0	0
M10-105	0	0	33	48,48	0	0	0	0	0	0	0	0
M11-106	0	0	28	32,14	0	0	0	0	22	22,73	0	0
M11-110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M11-116	19	50	32	56,25	0	0	17	11,76	24	20,83	17	17,65
MC-300	0	0	37	70,27	0	0	16	28,13	17	17,65	0	0
I-34 B	15	26,65	23	50	0	0	19	31,58	15	33,33	0	0
I-100 A	0	0	25	64	0	0	0	0	14	25	0	0
I-234	0	0	12	25	0	0	12	8,33	0	0	0	0
I-300 A	0	0	29	72,41	18	11,11	18	33,33	19	36,84	0	0
I-300 B	0	0	32	65,63	17	17,65	22	36,36	19	36,84	0	0
I-400 A	13	23,08	0	0	0	0	17	35,29	0	0	14	21,43
I-434 A	16	12,5	24	29,17	15	26,67	20	35	0	0	0	0
I-434 B	16	12,5	16	25	0	0	16,5	33,33	0	0	0	0
II-334 C	0	0	24	50	0	0	19	36,84	19	36,84	0	0
III-300 A	11	9,09	0	0	0	0	0	0	18	38,89	0	0
III-434 A	13	23,08	28	60,71	14	21,43	16	37,5	0	0	0	0

(*) Los halos son expresados en mm de diámetro de inhibición.

(**) se resaltan en rojo los mayores porcentajes de inhibición

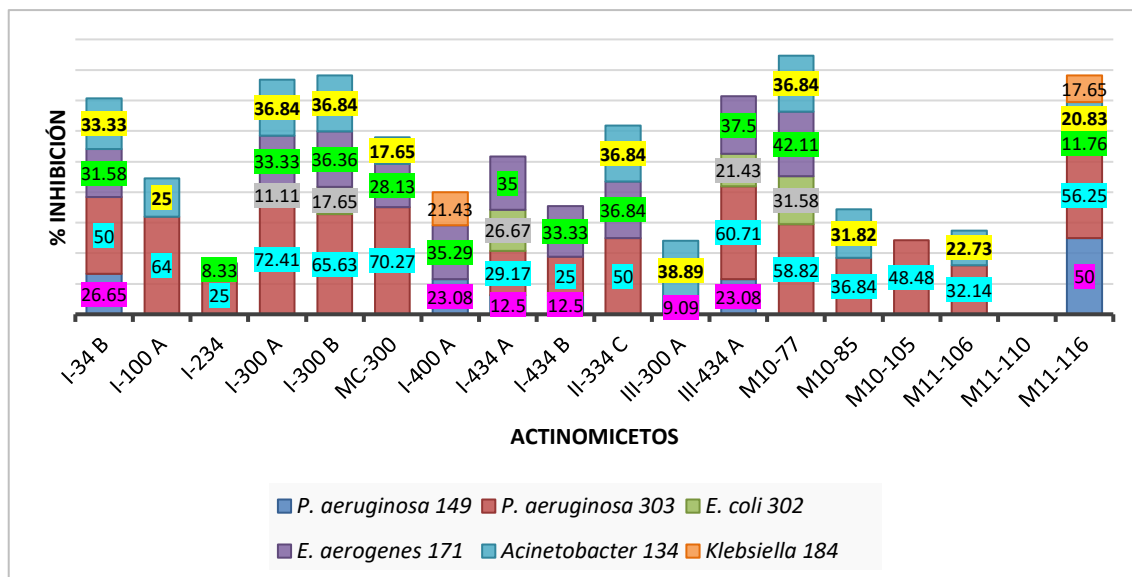


Figura 27. Actinomicetos (n = 18) de sedimento marino y su actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram negativos MDR.

5.4.4. Tamizaje de actividad antibacteriana frente a patógenos MDR Gram positivos

La actividad antimicrobiana de los actinomicetos contra los patógenos MDR Gram positivos en prueba, definitivamente fue mayor en comparación a los Gram negativos. Los resultados señalan que *Enterococcus* sp. 239 (aislado de una muestra de orina) y *Staphylococcus* 348 (coagulasa negativa y aislado de secreción vaginal) fueron las cepas de mayor sensibilidad, siendo afectados por 14 actinomicetos evaluados de un total de 16. Por otro lado, cabe señalar que los actinomicetos I-300 A, I-300 B, MC-300, II-334 C y M11-116 fueron las cepas que más resaltaron por su mayor espectro inhibitorio. En general, el tamaño de los halos de inhibición de los actinomicetos frente a los Gram positivos superó largamente a los señalados para Gram negativos. El halo de inhibición de mayor tamaño fue de 84 y 74 mm de diámetro (ofrecido por los actinomicetos cepa M11-116 y I-300 B contra *S. epidermidis* 1092 y *Enterococcus* sp. 239 respectivamente) aunque este resultado no necesariamente representa el mayor porcentaje inhibitorio. Cabe precisar que los actinomicetos I-400 A y MC-300 (ambos aislados de Ancón) alcanzaron los porcentajes inhibitorios más altos (82,86%) contra *Enterococcus* sp. 239 y *S. epidermidis* 1092. Asimismo, algunos actinomicetos (ejemplo las cepas I-100 A y III-200F) que en pruebas anteriores presentaron actividad inhibitoria, en esta ocasión no presentaron halos de inhibición o resultaron con menos actividad, tal como se puede observar en la Tabla 15 y Figura 28.

Tabla 15. Actividad antimicrobiana de cepas seleccionadas de actinomicetos marinos frente a patógenos Gram positivos MDR de origen clínico.

CEPAS (n=16)	<i>Enterococcus sp. 239</i>		<i>S. aureus 1094</i>		<i>S. epidermidis 1093</i>		<i>Staphylococcus coagulasa (-) 348</i>	
	Halo* (mm)	Inhib. (%)	Halo (mm)	Inhib. (%)	Halo (mm)	Inhib. (%)	Halo (mm)	Inhib. (%)
M10-77	72	79,17	64	71,88	0	0	70	70
M10-85	20	50	24	20,83	0	0	36	63,89
M10-105	50	70	41	71,95	0	0	44	68,18
M11-116	68	83,3	62	75	84	82,14	52	76,92
MC-300	60	75	70	80	70	82,86	58	79,31
I-34 B	66	81,33	0	0	50	76	60	78,33
I-100 A	0	0	0	0	0	0	0	0
I-234	46	76,09	0	0	50	75	44	68,18
I-300 A	60	75	70	80	70	75,71	58	79,31
I-300 C	74	73,65	70	75,71	70	73,57	60	70
I-400 A	70	82,86	0	0	70	82,86	60	78,33
I-434 A	70	80	0	0	70	77,14	60	76,67
I-434 B	70	74,29	0	0	70	82,86	60	71,67
II-334 C	56	72,32	40	70	58	75,86	26	50
III-200 F	0	0	0	0	0	0	18,5	8,11
B1T61	16,5	9,09	60	79,0	0	0	0	0

(*) Los halos son expresados en mm de diámetro de inhibición.

Se resaltan en negrita las cepas con mayor halo de inhibición y en roja los mayores porcentajes de actividad.

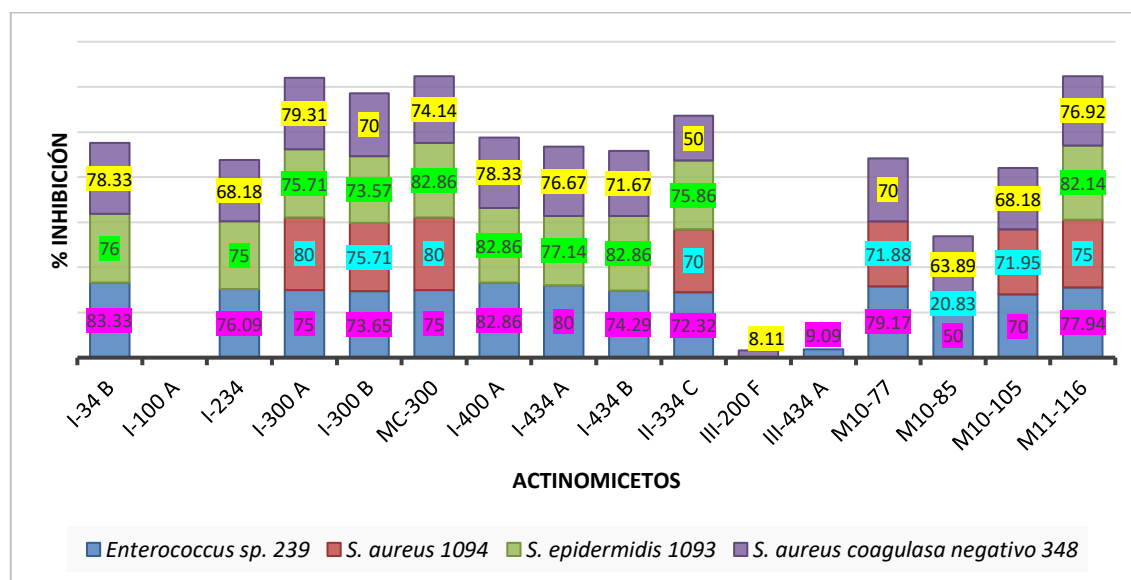


Figura 28. Actinomicetos aislados de sedimento marino y su actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram positivos MDR.

5.4.5. Actividad antibacteriana de actinomicetos aislados de esponjas

De un total de 31 muestras de esponjas colectadas se logró aislar 37 cepas de actinomicetos, 22 (59,4 %) fueron de Pucusana y 15 (40,6 %) de Marcona (Tabla 16).

La actividad antimicrobiana mostrada por los actinomicetos frente a los uropatógenos drogorresistentes en prueba señalan que, del total de aislados, 16 (43,2 %) presentaron al menos actividad inhibitoria de un patógeno MDR en prueba; 11 (29,7 %) mostraron actividad antimicrobiana solamente a *Staphylococcus aureus* MR, 4 (PUA, PU4-1, PU3-1, MAR6-5A) (10,8 %) lo hicieron a la vez frente a *Staphylococcus aureus* MR y *Enterococcus* sp. VanR. Solo 2 (MAR12-4A, MAR12-4B) (5,4 %) fueron activos contra *Enterococcus* sp. VanR; sin embargo, solo otros 2 (MAR16-4C y MAR16-4E) (5,4 %) presentaron actividad frente a cuatro patógenos MDR (*Staphylococcus aureus* MR, *E. coli* BLEE+, *E. coli* AMPc y *Proteus mirabilis* BLEE+) de los cinco en prueba (Tabla 16).

Tabla 16. Actinomicetos aislados de esponjas (n=37) y su actividad antimicrobiana frente a bacterias uropatógenas drogorresistentes (expresado como % de inhibición).

Lugar de aislamiento	Código de cepa	<i>S. aureus</i> MR	<i>Enterococcus</i> sp. VanR	<i>E. coli</i> BLEE+	<i>E. coli</i> ampC	<i>P. mirabilis</i> BLEE+
Pucusana	PU5-2	0	0	0	0	0
Pucusana	PU8-2	70.0	0	0	0	0
Pucusana	PU5-3	0	0	0	0	0
Pucusana	PU8-1	66.7	0	0	0	0
Pucusana	PU9-1	80.0	0	0	0	0
Pucusana	PU8-3	0	0	0	0	0
Pucusana	PU5-1	0	0	0	0	0
Pucusana	PU4-1	61.5	58.3	0	0	0
Pucusana	PU3-1	75.0	33.3	0	0	0
Pucusana	PU4-2	0	0	0	0	0
Pucusana	PU7-1	0	0	0	0	0
Pucusana	PU17-2	70.0	0	0	0	0
Pucusana	PU7-3	0	0	0	0	0
Pucusana	PU15-1	0	0	0	0	0
Pucusana	PU1-1	0	0	0	0	0
Pucusana	PU7-2	0	0	0	0	0
Pucusana	PU8-4	79.1	0	0	0	0
Pucusana	PU17-1	76.0	0	0	0	0
Pucusana	PU2-1	0	0	0	0	0
Pucusana	PU5-1	0	0	0	0	0
Pucusana	PUA	60.0	11.1	0	0	0
Pucusana	PUB	25.0	0	0	0	0
Marcona	MAR15-4	0	0	0	0	0
Marcona	MAR21-5	14.3	0	0	0	0
Marcona	MAR14-4A	0	0	0	0	0
Marcona	MAR12-4A	0	31.3	0	0	0
Marcona	MAR12-4B	0	62.5	0	0	0
Marcona	MAR20-5A	70.0	0	0	0	0
Marcona	MAR6-4B	0	0	0	0	0
Marcona	MAR6-4C	0	0	0	0	0
Marcona	MAR6-4D	0	0	0	0	0
Marcona	MAR6-5A	70.0	80.0	0	0	0
Marcona	MAR6-5B	60.0	0	0	0	0
Marcona	MAR16-4A	0	0	0	0	0
Marcona	MAR16-4B	0	0	0	0	0
Marcona	MAR16-4C	89.5	0	60.0	45.0	76.7
Marcona	MAR16-4E	66,7	0	79.2	16.7	80.0

Se resalta en negrita las cepas de mayor actividad antagonista.

En cuanto a la evaluación por zona de muestreo, de los actinomicetos procedentes de esponjas de Pucusana se obtuvieron 10 cepas con actividad antibacteriana, mientras que de los actinomicetos procedentes de esponjas de Marcona se obtuvieron solamente 8 cepas con dicha actividad. Igualmente, los resultados se muestran en la Tabla 16.

Algunos actinomicetos mostraron mayor amplitud de actividad frente a los patógenos, siendo las cepas codificadas como PU9-1, PU8-4, PU17-1, MAR6-5A, MAR16-4C y MAR16-4E las que más resaltaron por su actividad antimicrobiana, siendo, además, estas últimas las cepas inhibitorias de *E. coli* BLEE+ y *S. aureus* MR (Figura 29 y Figura 30)

Los patógenos Gram positivos fueron más sensibles en relación con los Gram negativos. Los porcentajes de inhibición fluctuaron desde valores bajos como 11,1 % hasta un máximo de 89,5%; éste último mostrado por la cepa MAR16-4E frente a *S. aureus* MR y aislada de la esponja *Haliclona* sp. colectada en Marcona, cuyo halo de inhibición superó los 40 mm de diámetro (Figura 30).

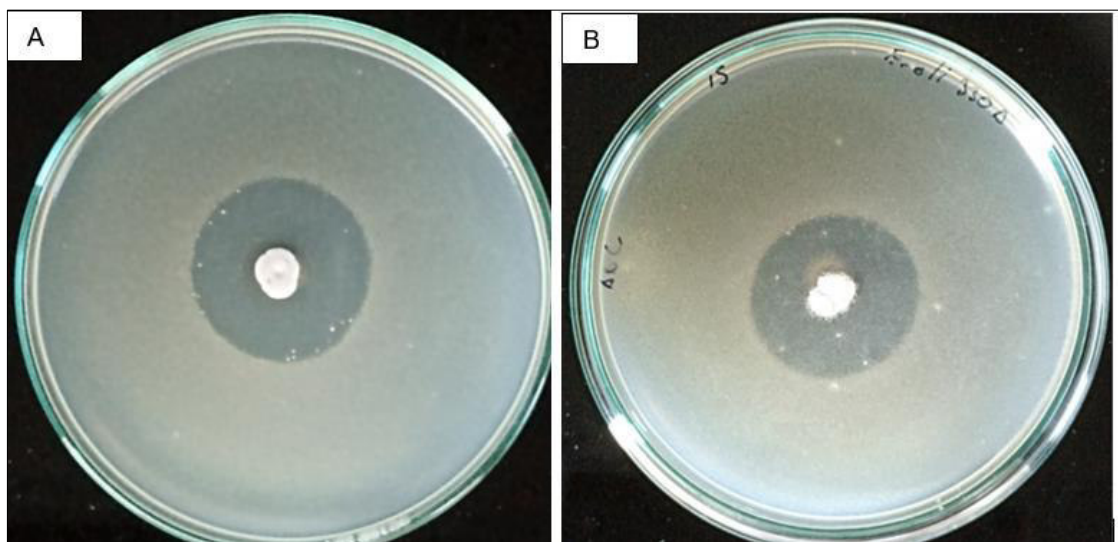


Figura 29. Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de la esponja *Haliclona* sp. colectadas en “playa hermosa” (Marcona, Ica). **A:** cepa MAR16-4E frente a *E. coli* BLEE+; **B:** cepa MAR16-4C frente a *E. coli* BLEE+.

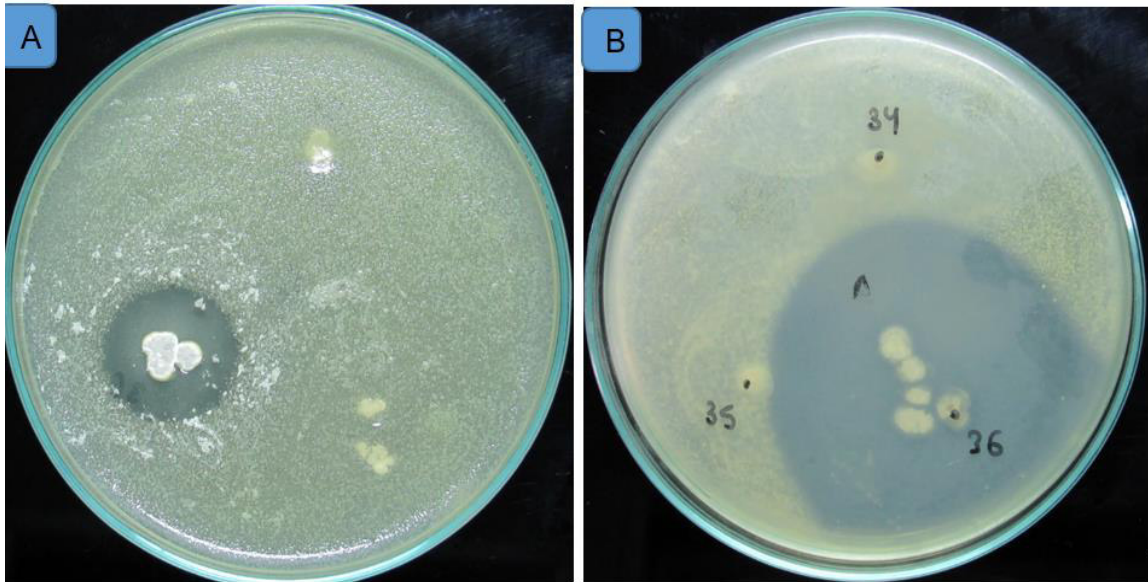


Figura 30. Actividad antimicrobiana del actinomiceto MAR16-4C frente a *E. coli* BLEE+ (A) y *S. aureus* MR (B).

5.5. Obtención de extractos crudos y actividad antimicrobiana

Habiéndose utilizado tres tipos de solventes de diferentes polaridades en la obtención de extractos crudos de actinomicetos seleccionados, los resultados señalan claramente que los tres fueron útiles (unos más que otros) en la recuperación de los metabolitos con actividad antimicrobiana. La Tabla 17 muestra los resultados de estas pruebas con cuatro actinomicetos (I434A, I434B, MC 300 y M10 77) aislados de sedimento marino.

Cabe señalar que *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mostró ser el patógenos de mayor sensibilidad cuando fue tratado directamente con 10 μ L de cada extracto sobre el césped de cultivos en placas (Tabla 17). Por otro lado, los extractos diclorometánicos de las cepas I434-B y M10-77 generaron los halos de inhibición de mayor tamaño actuando contra *S. aureus* ATCC 43300 y *E. faecalis* ATCC 29212.

De manera similar el extracto crudo obtenido de la cepa M10-77 utilizando dos solventes orgánicos (acetato de etilo y diclorometano) y aplicado sobre un césped de cultivo de *S. aureus* ATCC 43300 mostró mayor actividad inhibitoria el extracto diclorometánico en comparación con el extracto obtenido con acetato de etilo (Tabla 18 y Figura 31).

Cabe señalar que el halo de inhibición (24 mm de diámetro) se encuentra algo cercano al disco de ciprofloxacina (5,0 μ g) utilizado en este caso como control positivo (Tabla 18 y Figura 31). Por otro lado, la actividad antimicrobiana del extracto de acetato de etilo contra ambos patógenos fue discreto produciendo halos de inhibición de menor tamaño.

Tabla 17. Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos crudos de actinomicetos marinos seleccionados (método de inoculación directa).

ACTINOMICETO	Solvente	Cepas testigo (mm de diámetro de actividad inhibitoria)	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
I 434A	A	*	11
	B	6	11
	D	*	*
I 434 B	A	*	6
	B	6	8
	D	12	5
MC 300	A	6	7
	B	8	6
	D	6	7
M10 77	A	5	6
	B	9	8
	D	16	15

*Medidas menores a 5 mm de diámetro, a veces imperceptibles.
 Concentración de extractos crudos: 2 mg/mL
 Solventes: **A**: Acetato de etilo; **B**: n – Butanol; **D**: Diclorometano.

Tabla 18. Actividad inhibitoria del extracto diclorometánico (20 mg/ml) de la cepa M10-77 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (método de difusión en “pocillo”).

	Diámetro del pocillo (mm)	Diámetro de inhibición (mm)
DMSO (control negativo) (30 µL)	6	-
Extracto de acetato de etilo	6	7
Extracto diclorometánico	6	24
Ciprofloxacina (control positivo) (5,0 µg)	-	35

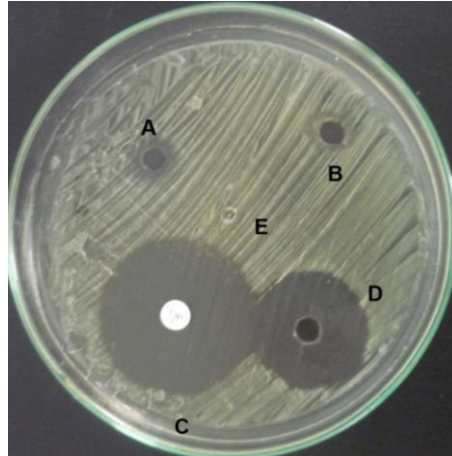


Figura 31. Actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico (D) de la cepa M10-77 frente a *S. aureus* ATCC 43300. Extractos: **A:** acetato de etilo; **B:** n-butanólico; **C:** Ciprofloxacina (5 μ g) (control positivo); **E:** DMSO (control negativo).

5.6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del actinomiceto cepa M10-77

Esta prueba se llevó a cabo utilizando el extracto diclorometánico proveniente del actinomiceto cepa M10-77 que inhibió a *S. aureus* ATCC 43300 MR y *E. faecalis* ATCC 51299 VR. Un primer método consistió en el uso de pocillos elaborados en placas de agar, cuyos resultados se aprecian en la Tabla 19 y Figura 32, mostrando la disminución gradual de los halos de actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico del actinomiceto cepa M10-77. El resultado muestra también halos de inhibición muy marcado cuya CMI fue calculada en 7,81 μ g/ml. Streptomicina (10 μ g) y eritromicina (15 μ g) fueron los controles positivos, que solo fue ligeramente superior a la actividad mostrada por 15,62 μ g/ml del extracto con diclorometano del actinomiceto identificado posteriormente como *Streptomyces erythrogriseus* cepa M10-77.

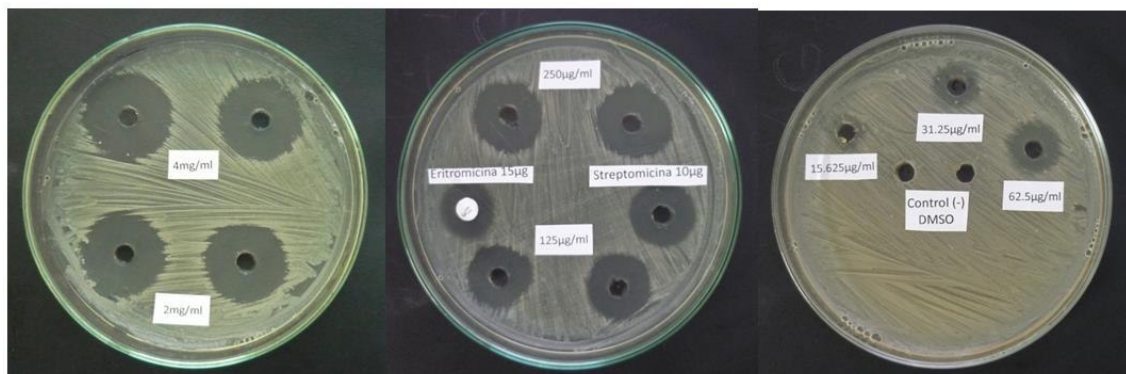


Figura 32. Extracto diclorometánico de *Streptomyces* M10 – 77 y su actividad antimicrobiana a *S. aureus* ATCC 43300 (meticilino resistente). Es notorio que a la concentración de 15,625 μ g/ml aún mantiene actividad inhibitoria.

Tabla 19. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto diclorometánico de la cepa M10-77 frente a *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) (Método de difusión en “pocillo”).

Concentración (mg/mL)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
4	26
2	24
1	22
0,5	20
0,25	20
0,125	19
0,0625	13
0,03125	11,5
0,015625	8
0,0078125 (7,81 µg/mL)	-
Streptomicina 10 µg (control positivo)	18
Control positivo (Eritromicina 15 µg)	14
Control negativo (DMSO)	-

*El control negativo no generó inhibición, el diámetro del pocillo fue de 5 mm
El inóculo fue de 20 µL de dilución en cada pocillo.

La CMI de los extractos crudos fue también calculada mediante el método de microdiluciones en microplacas (Figura 33). La Tabla 20 muestra el resultado que deriva de esta prueba. Tal como se aprecia la CMI fue calculada en 10 µg/mL frente a *S. aureus* ATCC 43300 y en 1,25 µg/mL para *E. faecalis* ATCC 51299.



Figura 33. Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL) del actinomiceto cepa M10-77 por el método microdilución en microplacas.

Tabla 20. Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los extractos de la cepa M10-77.

	Extracto Diclorometánico, cepa M10-77	Streptomicina (10 μg) (control)
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (meticilino resistente)	10,0	10,0
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (vancomicina resistente)	1,25	5,0

5.7. Actividad anti-*Candida albicans*

Del total de 62 cepas de actinomicetos marinos inicialmente evaluados por su actividad anti-*Candida*, 20 actinomicetos (27,42%) resultaron tener actividad inhibitoria de diferentes cultivos de *Candida albicans* de origen clínico (Tabla 21; Figura 34 y Figura 35), siendo la cepa M11-125 una de las mejores que generaron halos de inhibición de mayor tamaño (52,5 mm) frente a dos representantes de *Candida albicans* patógenas. Por su parte la cepa MC 300 mostró actividad antagonista frente a 6 de los 7 miembros de *Candida albicans* probadas en el presente experimento. La cepa M10 77 es la tercera en importancia que mostró actividad anti-*Candida*, aunque los halos de actividad fueron algo menores que en los casos anteriores. Igualmente, en la Tabla 21 y las Figuras 35 y 36 se resalta la actividad anti-*Candida* de otras cepas de actinomicetos que muestra actividad considerable tanto en cultivos directos como del extracto crudo obtenido por solventes (Figura 35).

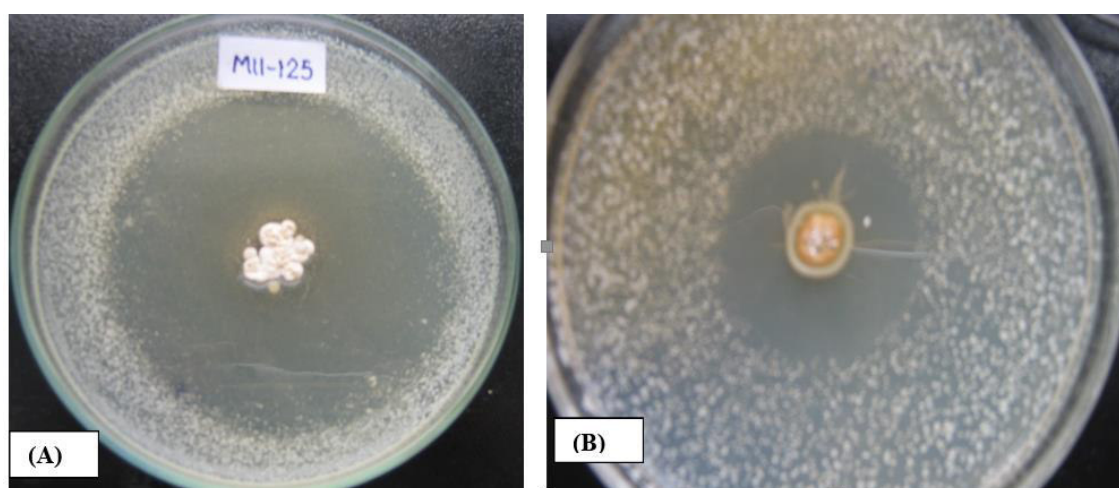


Figura 34. Actividad anti-*Candida albicans* C 1415 de actinomicetos: M11-125 (A) y M10-77 (B) con 52,5 y 25 mm de diámetro de halos de inhibición respectivamente.

Tabla 21. Actividad antifúngica (expresada como halos de inhibición) de actinomicetos marinos (n=20) frente a cepas de *Candida albicans* de origen clínico.

Cepas	Cepas indicadoras						
	<i>C. albicans</i> B4604	<i>C. albicans</i> B4606	<i>C. albicans</i> C157	<i>C. albicans</i> C1415	<i>C. albicans</i> C1656	<i>C. albicans</i> 1511	<i>C. albicans</i> 1511 MIC
M11-108	21,0	0	0	7,5	0	0	0
M11-116	20,0	0	31	0	20,5	0	0
M11-120	0	0	0	7,5	0	14	0
M11-125	0	0	0	52,5	52,5	7,5	5,5
M11-133	30,50	30,50	0	22,0	30,5	7,5	6,5
M12-141	0	0	0	8	0	13,5	0
M10-77	0	23,5	35,0	25,0	0	5	12,5
I-34A	0	32,0	0	40,0	33,0	10,5	0
I-434 A	0	0	0	0	0	0	16,5
I-434 B	30,0	0	0	0	18,0	10,5	0
I-300 A	0	28,5	0	0	20,0	0	10,0
I-300B	0	0	0	0	0	9,5	7,5
MC-300	52,0	23,0	30,5	20,0	0	8,4	8,5
I-400 A	0	0	0	0	18,5	7,5	0
I-400 B	20,0	0	0	0	0	5	5
II-334 A	0	16,0	0	13,0	0	8,5	0
II-334 B	0	0	35,0	0	0	5	0
II-334 C	22,0	0	0	20,0	0	5	0
III-400B	0	48,0	28,0	0	52,0	0	0
III-434 C	0	26,0	0	58,5	34,0	10,4	0

(*) Actividad expresada en mm del diámetro del halo de inhibición. Se resalta en rojo los actinomicetos de mayor actividad anti-*Candida albicans*.

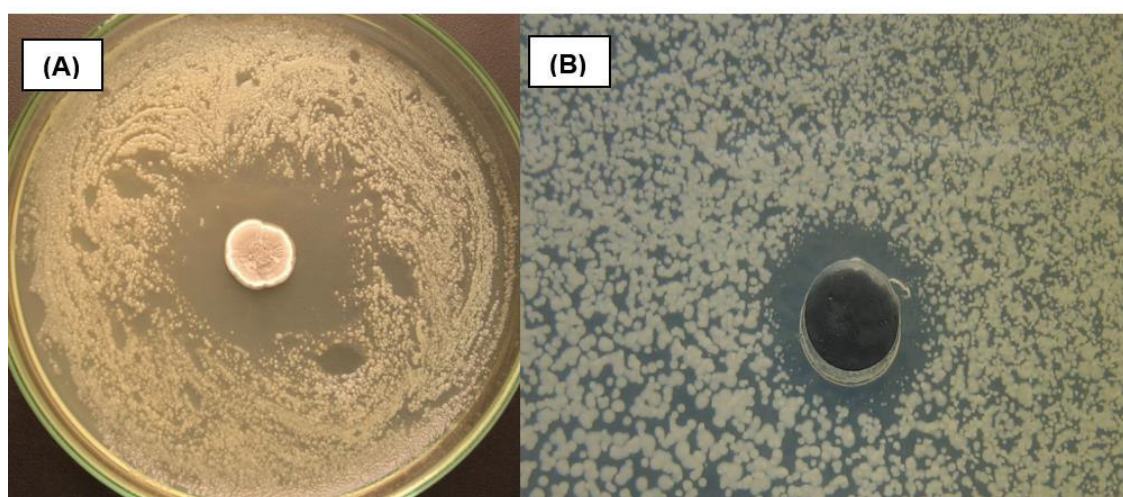


Figura 35. Actividad anti-*Candida albicans* cepa 1511 del actinomiceto III 434C. **A:** actividad en placa; **B:** actividad del “extracto crudo” (30 µL).

La evaluación anti-*Candida* de las 20 cepas de actinomicetos aislados de sedimento marino merecen comentario aparte. Fueron siete las cepas indicadoras utilizadas en esta prueba, todas pertenecientes a la especie de *C. albicans* y provenientes de pacientes de atención ambulatorio (proporcionados por un centro hospitalario). Los resultados de estas evaluaciones *in vitro* indicaron que, la cepa de *C. albicans* 1511 mostró ser la cepa más sensible a la acción inhibitoria de los actinomicetos (14/20); seguida por la cepa *C. albicans* C1415 (11/20), siendo la cepa de *C. albicans* C1656 tercero en sensibilidad (9/20); sin embargo, el porcentaje de sensibilidad más alta presentó la cepa *C. albicans* C1415 frente al actinomiceto III 434C (halo de inhibición de 58,5 mm).

De la misma forma se puede señalar que 86,5 % de los actinomicetos inhibieron a la cepa *C. albicans* 1511; el 55,75 % de los actinomicetos tuvieron actividad inhibitoria de *C. albicans* cepa C1415, 45% contra *C. albicans* B4606 y 36% contra *C. albicans* B4604. Sin embargo, el 28% mostraron actividad moderada contra *C. albicans* C1656 y solamente el 14% contra *C. albicans* C157. Los actinomicetos III 434 C, M11-125, MC 300 y M10-77 mostraron gran actividad inhibitoria frente a estas levaduras, especialmente frente a *Candida albicans* cepa C1415.

Las cepas señaladas como M11-125, MC-300, I-34A y III-434C fueron las que exhibieron mayor actividad inhibitoria frente a las diferentes cepas de *C. albicans*. Las cepas II 434C y M11-125 mostraron la mayor actividad inhibitoria frente a *Candida albicans* C1415 y *Candida albicans* C1656 logrando alcanzar en ambos casos hasta 58,5 y 52.5 mm de halo de inhibición. Cabe resaltar que la actividad antifúngica que mostraron los actinomicetos marinos reportados en el presente trabajo alcanzó halos de inhibición de 35 mm de diámetro como promedio.

5.8. Análisis filogenético de cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de sedimento marino

Siete cepas de actinomicetos (M10-77, MC-300, M11-105, M11-116, B1T61, I-434B, I-300C) aislados de sedimento marino fueron seleccionadas por su mayor actividad antimicrobiana frente a patógenos multidrogosresistentes, cuyo análisis filogenético señala que todas pertenecen al género *Streptomyces* del grupo de Actinobacterias, siendo destacable la cepa M10 - 77 que presenta porcentaje de similitud al 99% con la especie *Streptomyces erythrogriseus* (León *et al.*, 2011) (Figura 36).

Por otro lado, la cepa MC-300 no fue vinculada a alguna especie conocida ya registrada en el GenBank; en consecuencia, queda como *Streptomyces* sp. MC-300 (Figura 36) y

la posibilidad de pertenecer a una nueva especie; sin embargo, será necesario análisis moleculares adicionales que se conoce por su sigla como ANI (Average Nucleotide Identity) que compara los genes de las especies cercanas o el estudio del genoma completo; si el valor que arroja es menor del 95%, potencialmente sería una nueva especie. Aun así, el resultado se considera debatible.

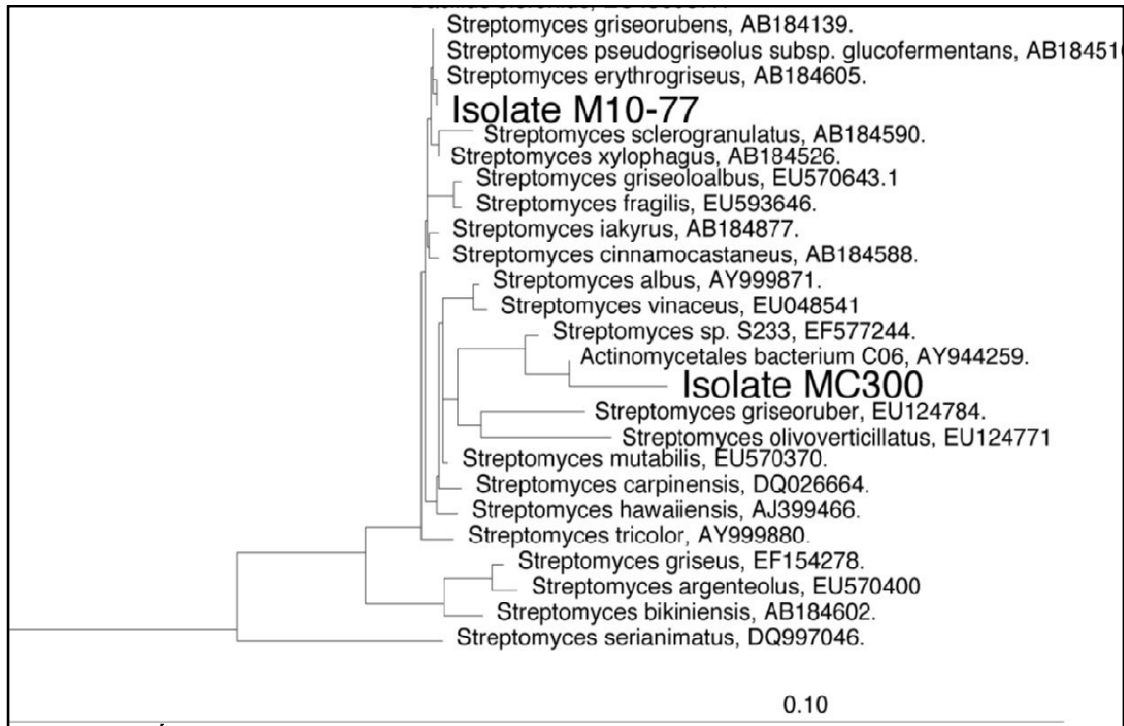


Figura 36. Árbol filogenético de los actinomicetos cepas M10-77 y MC 300, aislados de sedimento marino e identificados como miembros del género *Streptomyces* en base al análisis de su RNAr 16S. La cepa M10-77, presentó similitud al 99% con *Streptomyces erythrogriseus* (AB184605) (León *et al.*, 2011).

Las cinco cepas restantes fueron también identificadas como miembros del género *Streptomyces*; sin embargo, sólo las cepas I-434B y I-300C fueron identificadas como *Streptomyces variabilis* y *Streptomyces rochei* respectivamente. Igualmente, las cepas M11-105, M11-116 y B1T61 no fueron identificadas a nivel de especie, en consecuencia, fueron definidas solo como *Streptomyces* sp. (Figura 37).

Para la elaboración del árbol filogenético de los actinomicetos aislados de sedimento, este proceso fue seguido tomando en cuenta el método estadístico Neighbor-Joining en base a la relación que existe entre las secuencias del gen RNAr 16S de cepas aisladas desde sedimentos y especies que guardan relación con *Streptomyces*.

En la Figura 37 se denota los números internos que corresponden a los valores de soporte de Bootstrap. Igualmente, entre paréntesis se indican los números accedados

al repositorio GenBank. Asimismo, se deja establecido en el diseño del árbol filogenético las secuencias alcanzadas por *Nocardia asteroides*, *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* por su cercanía al género *Streptomyces*; en tanto, *Bacillus subtilis* fue elegido como externa al grupo.

Las secuencias del RNAr 16S de las cepas de *Streptomyces* aisladas en el presente trabajo e identificadas a nivel filogenético han sido depositadas en el repositorio del GenBank según la codificación señalada en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultado del análisis filogenético de cinco cepas seleccionadas de actinomicetos que fueron aislados de sedimento marino de la costa central de Perú.

Actinomicetos (cepas)	Identificación genotípica (16 S rARN)	Nº de pb	Código de acceso GenBank
B1T61	<i>Streptomyces sp.</i>	1302	MN964279.1
I 434 B	<i>Streptomyces variabilis</i>	1321	MT084571.1
M11-116	<i>Streptomyces sp.</i>	1255	OQ935582.1
M11-105	<i>Streptomyces sp.</i>	1186	MN964333.1
I300C	<i>Streptomyces rochei</i>	1300	OQ935581.1

Asimismo, el análisis filogenético (árbol según modelo estadístico Neighbor-Joining) reveló las secuencias de los pares de bases (pb) para cada una de las cepas de *Streptomyces* aisladas, indicando cierta similitud entre si (Tabla 22).

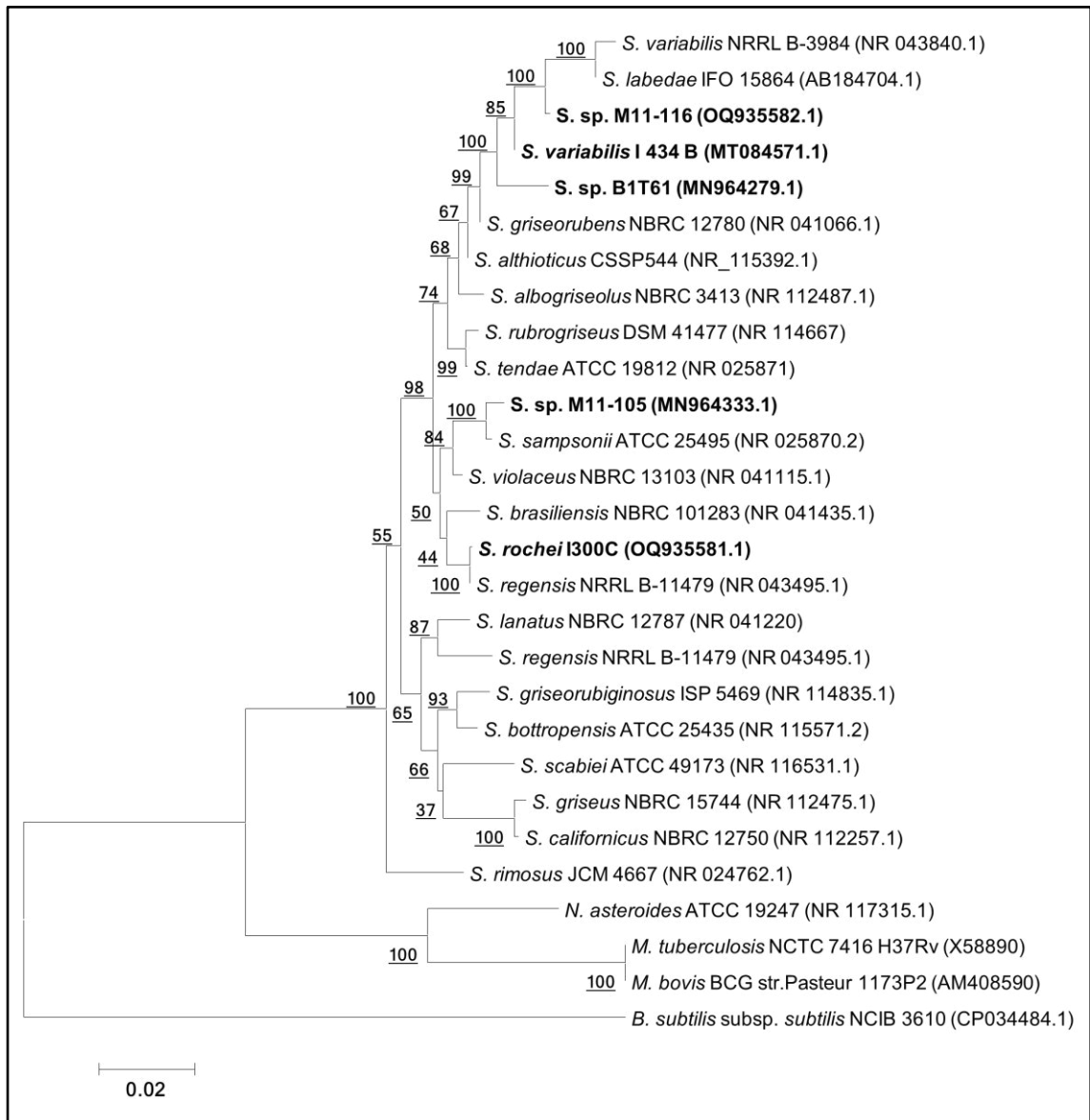


Figura 37. Árbol filogenético de actinomicetos de sedimento marino de la costa central de Perú. El árbol fue elaborado según el método estadístico Neighbor-Joining en base a la relación que existe entre las secuencias del gen RNAr 16S de cepas aisladas de muestras de sedimentos marinos y especies que guardan relación con *Streptomyces* (barra, 0,02 sustituciones por posición de nucleótido). Los números internos corresponden a los valores de soporte de Bootstrap (1000 réplicas).

5.9. Análisis filogenético de cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de esponjas marinas

Todos los aislados de actinomicetos que provienen de esponjas fueron caracterizados mediante técnicas microbiológicas convencionales; sin embargo, los seleccionados por su mayor actividad antagonista a los uropatógenos fueron sometidos además al análisis filogenético. De acuerdo con los resultados del análisis de RNAr 16S todas pertenecen al género *Streptomyces*, pero tres de ellas (MAR6-5A, MAR6-5B y MAR12-4A) aisladas de la esponja *Haliclona* colectadas en la playa Hermosa de San Juan de Marcona están estrechamente relacionadas (> 98 %) con *Streptomyces pulveraceus*, *Streptomyces aureoversilis* y *Streptomyces globisporus* respectivamente (Figura 38). Por otro lado, la cepa MAR16-4E no fue vinculada a ninguna especie previamente registrada y por lo tanto fue designada como *Streptomyces* sp. MAR16-4E. Las secuencias fueron enviadas al NCBI del GenBank donde fueron registradas con su respectivo número de acceso (Tabla 23).

La Figura 38 muestra el árbol filogenético elaborado de acuerdo con el método estadístico Neighbor-Joining en base a la relación existente de las secuencias del gen RNAr 16S de cepas previamente aisladas de fuentes marinas y relacionadas a especies de *Streptomyces*. La numeración interna corresponde a los valores soporte Bootstrap (60 %). Asimismo, la codificación en paréntesis corresponde a los números de acceso al repositorio GenBank. En la elaboración del árbol se eligió a *Bacillus subtilis* como secuencia externa al grupo. (barra representa 0,02 sustituciones por posición de nucleótido).

Tabla 23. Identificación filogenética de cepas seleccionadas de *Streptomyces*, aisladas de esponjas del género *Haliclona* sp. colectadas en la localidad de San Juan de Marcona (Ica).

Actinomicetos (cepas)	Especies identificadas BLASTN	Porcentaje DE ID (%)	Código de acceso al GenBank
MAR6-5A	<i>Streptomyces pulveraceus</i>	100.00	MN419229.1
MAR6-5B	<i>Streptomyces aureoversilis</i>	98.46	MN419230.1
MAR12-4A	<i>Streptomyces globisporus</i>	100.00	MN419232.1
MAR16-4E	<i>Streptomyces</i> sp.	98.18	MN419231.1

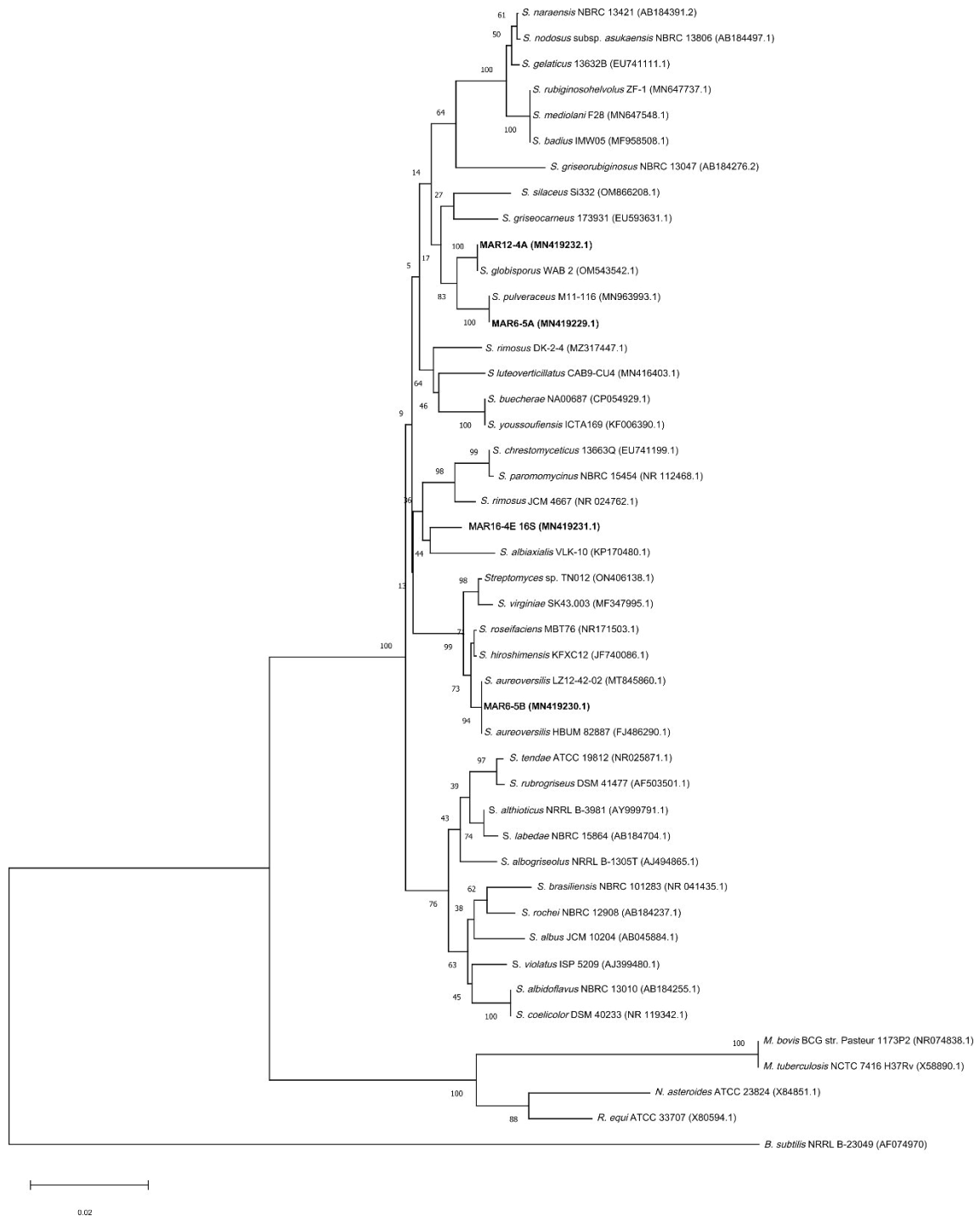


Figura 38. Árbol filogenético construido según el método de inferencia Neighbor-Joining basado en la relación entre las secuencias del gen RNAr 16S de los actinomicetos (resaltados en negrita) aislados de la esponja *Haliclona* sp. colectadas en la playa Hermosa – Marcona, Perú y especies relacionadas de *Streptomyces*. Los números internos corresponden a los valores de soporte de Bootstrap (1000 réplicas). Entre paréntesis son los números de acceso al GenBank. La secuencia de gen RNAr 16S de *Bacillus subtilis* fue elegida como externa al grupo. (Barra, 0,02 sustituciones por posición de nucleótido).

5.10. Observaciones por Microscopía Electrónica de Barrido

El uso del microscopio electrónico de barrido permite distinguir la morfología y el estado de desarrollo de los actinomicetos en estudio; esto es, mediante la observación diferenciada de las estructuras miceliales sean éstas del substrato o aéreo es posible comprender la etapa de desarrollo alcanzado al cabo de cierto tiempo de incubación. Para una correcta interpretación de imágenes y comprensión total de estas estructuras es imperativo un procesamiento correcto para que el material se mantenga intacto y sin mayor daño (Kurtböke, 2022)

Los actinomicetos marinos seleccionados por su mayor actividad antimicrobiana, aislados tanto de sedimentos como de esponjas, a pesar de que fueron cultivados e incubados bajo las mismas condiciones de laboratorio, al ser observados bajo microscopía electrónica de barrido presentan diferencias morfológicas sustanciales. Estas diferencias implican la morfología micelial aéreo o de substrato, pero sobre todo esporular.

En el presente trabajo, las muestras fueron procesadas después de una incubación de 7 días, tiempo suficiente para la formación de la cadena de esporas en su mayor parte tal como se puede observar en la Figura 39 y Figura 40; sin embargo, fue posible la observación de hifas aún sin fragmentación (MAR 16C) o escasamente fragmentadas que indican el estado de desarrollo micelial o vegetativo del actinomiceto, tal como se observa en la Figura 40 (D y E) (aislado de esponjas colectadas en San Juan de Marcona). La mayoría de las observaciones proporcionan imágenes de estructuras flexibles y sinuosas, aunque escasamente en espiral evidencia de la presencia del género *Streptomyces*. Asimismo, la mayoría presentan esporas grises en forma cilíndrica y una superficie aparentemente lisa. No se observaron remolinos, gránulos escleróticos, esporangios y esporas flageladas, tal como mencionan otros autores (Prakash y Nawani, 2014; Mondal y Thomas, 2022), tampoco se observaron esporas con espículas (tal vez porque el aumento máximo alcanzado fue de 12000X de magnificación).

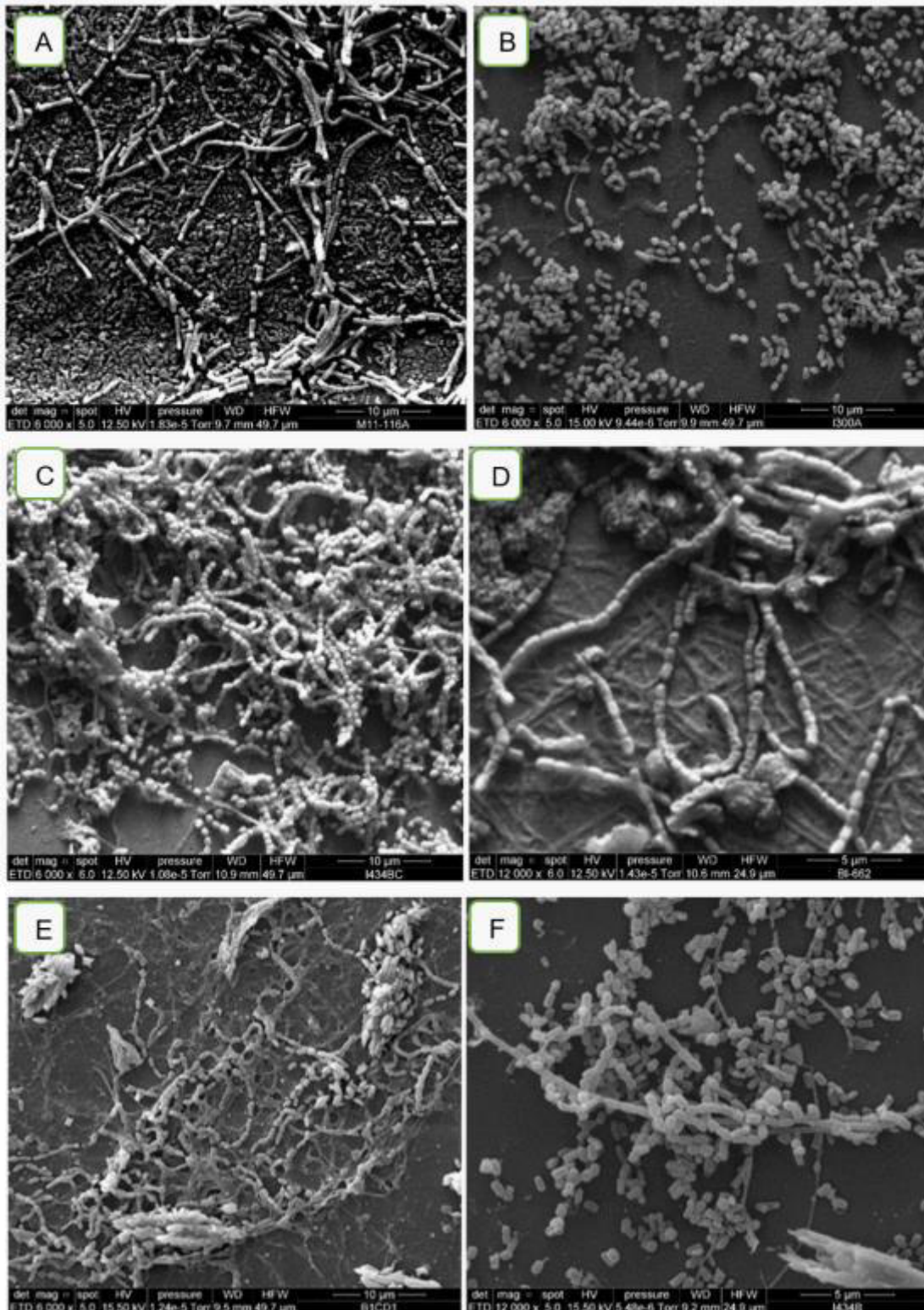


Figura 39. Microfotografías de actinomicetos aislados de sedimento marino colectados en el litoral central de Perú. **A:** cepa M11-116A (6000X); **B:** cepa I 300A (6000X); **C:** cepa I 434C (6000X); **D:** cepa BI 662 (12000X); **E:** cepa B1CD1 (6000X) y **F:** cepa I 434B (12000X).

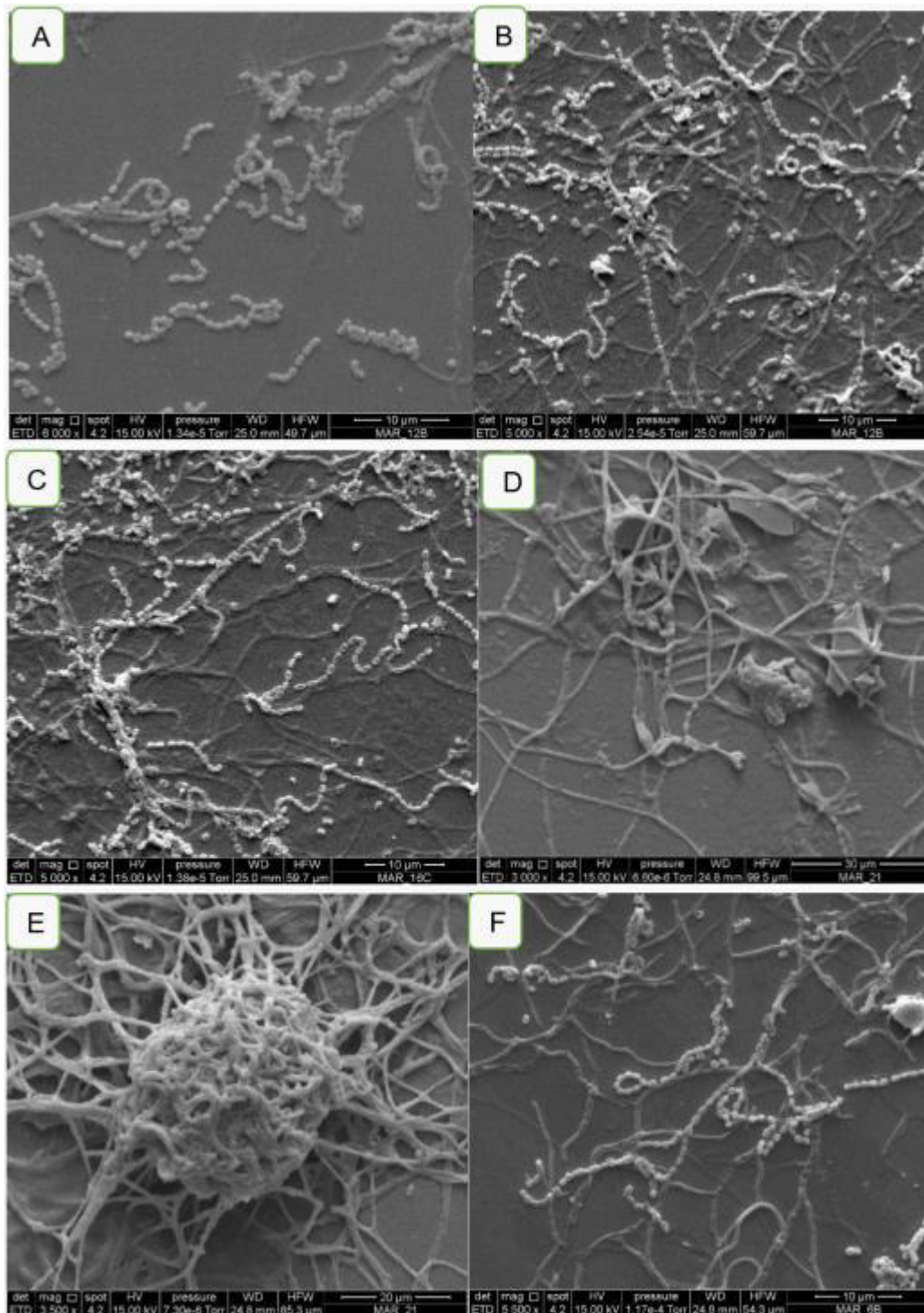


Figura 40. Microfotografías de actinomicetos aislados de esponjas marinas del género *Haliclona* sp. colectadas en playa Hermosa – San Juan de Marcona - Ica. **A y B:** cepa MAR 12B; **C:** cepa MAR 16C; **D y E:** cepa MAR 21 y **F:** cepa MAR 6B.

5.11. Crecimiento y actividad antimicrobiana de los actinomicetos cultivados en presencia/ausencia de agua de mar.

En el aislamiento primario como ya fue comentado anteriormente los actinomicetos crecieron de manera óptima en Agar Marino (preparado con agua de mar cuya concentración de NaCl es de 3,5 %); sin embargo, los cultivos en medios conteniendo los mismos componentes, pero preparados con agua desionizada (0 % de NaCl) señalaron ausencia total de crecimiento de dos actinomicetos (M11-103 y M11-125), pero en la mayoría se observó crecimiento restringido (Tabla 24, Figura 41), salvo algunas excepciones que mostraron la formación de colonias sin mayores diferencias.

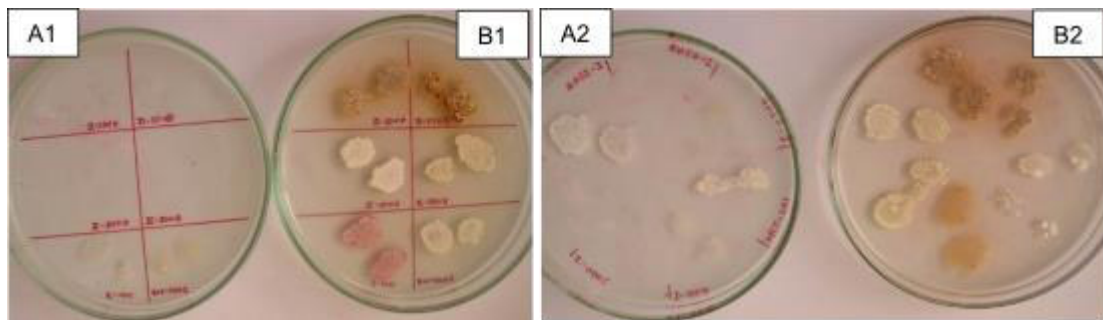


Figura 41. Cultivo de actinomicetos marinos en presencia y ausencia de agua de mar. Nótese el escaso o nulo crecimiento en el medio preparado con agua desionizada (A1, A2) en comparación con el medio conteniendo agua de mar (B1, B2).

En subcultivos posteriores se ha observado el mismo comportamiento inicial en Agar Marino, pero el crecimiento en el medio preparado con agua desionizada (AD) fue mejorando paulatinamente hasta obtener colonias de tamaño considerable, siendo en algunos casos de tamaño similar que en AM. Estos resultados se interpretan como una manifestación de adaptación de los cultivos marinos a las condiciones de laboratorio. Inclusive el tiempo de crecimiento de 7 a 14 días se redujo a 5 a 7 como máximo.

Por otro lado, las pruebas realizadas para determinar el rendimiento antimicrobiano de los actinomicetos en cultivos preparados con agua de mar (3,5 % de NaCl) (AM) y con agua des-ionizada (AD) nos indica que el componente Na⁺ presente en el agua de mar es de vital importancia para los actinomicetos marinos en la manifestación de su actividad inhibitoria frente al patógeno MDR *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (metilino resistente). Los resultados de una evaluación comparativa señalan que a pesar de un crecimiento considerable de los actinomicetos en AD su actividad inhibitoria se reduce considerablemente, salvo algunas excepciones (Figura 43) donde el halo de inhibición de la cepa testigo fue mayor que en AM.

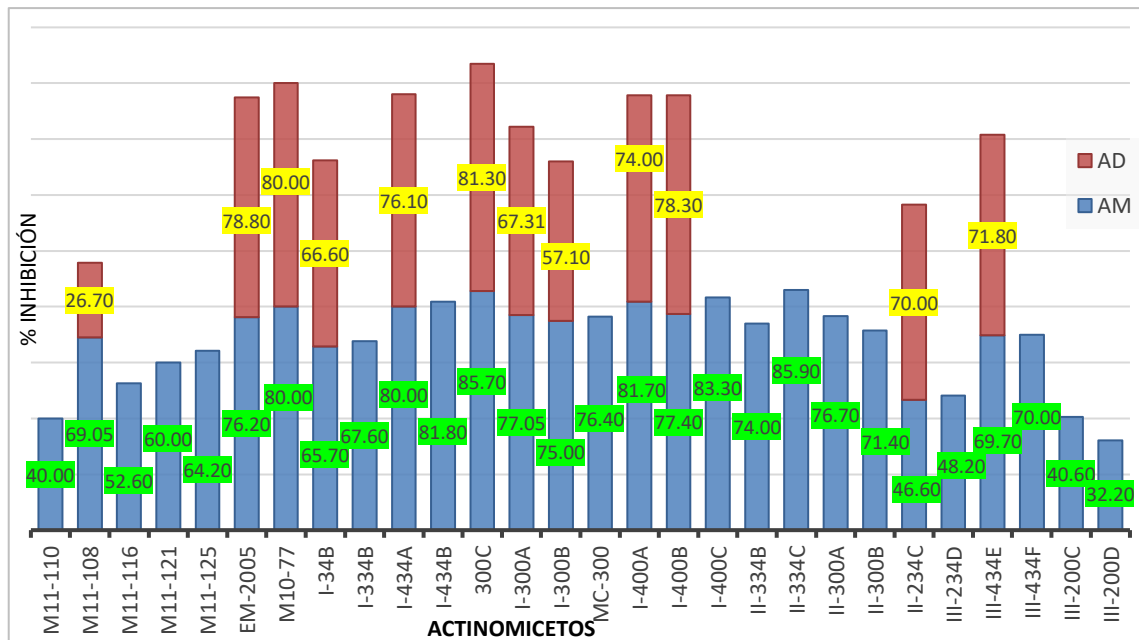


Figura 42. Porcentaje de inhibición de actinomicetos (n=28) a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 cultivados en presencia (AM) y ausencia (AD) de agua de mar.

En el presente trabajo, de 62 actinomicetos evaluados lograron manifestar su actividad inhibitoria inicialmente 28 cepas (Figura 43); sin embargo, solo 12 (19,6 %), resaltaron actividad antimicrobiana de consideración, entre ellas las cepas EM-2005, M10-77, I-434 A, 300 C, I-400 A, I-400 C, que lograron crecer de manera óptima en el medio AD con un rendimiento antimicrobiano frente al patógeno MDR evaluado en este estudio (Tabla 24).

Tabla 24. Crecimiento de actinomicetos y su actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 43300 en cultivos preparados con agua de mar (AM) y agua desionizada (AD).

CEPAS	Crecimiento con		Halo de inhibición (mm)		% de inhibición	
	Agua de mar (AM)	Agua desionizada (AD)	AM	AD	AM	AD
M11-105	+++	++	-	-	0	0
M11-106	+++	++	-	-	0	0
M11-110	++++	+++	19	-	40,0	0
M11-108	+++	+++	42	15	69,05	26,7
M11-118	+++	++	-	-	0	0
M11-103	++	NC	-	-	0	0
M11-116	+++	+++	19	-	52,6	0
M11-121	++	+	15	-	60,0	0
M11-125	+++	NC	28	-	64,2	0
M11-131	++	++	-	-	0	0
M11-133	++++	++	-	-	0	0
EM-2005	+++	++	42	33	76,2	78,8
M10-85	+++	-	-	-	0	0
M12-141	++	+	-	-	0	0
M10-77	++++	+++	60	30	80,0	80,0
AC16	+++	+	-	-	0	0
I-34A	+++	++	-	-	0	0
I-34B	+++	++	38	30	65,7	66,6
I-234	+++	+	-	-	0	0
I-334A	+++	+++	-	-	0	0
I-334B	+++	++	34	-	67,6	0
I-434A	++	+	60	46	80,0	76,1
I-434B	++	+	55	-	81,8	0
300C	+++	+++	70	48	85,7	81,3
I-100A	++	++	-	-	0	0
I-100B	+++	+	-	-	0	0
I-300A	++++	++++	61	52	77,05	67,31
I-300B	+++	++++	40	28	75,0	57,1
MC-300	+++	+	55	-	76,4	0
I-400A	++++	+++	60	50	81,7	74,0
I-400B	++++	++	62	60	77,4	78,3
I-400C	+++	++	54	-	83,3	0
II-334A	++	+	-	-	0	0
II-334B	++++	+++	50	-	74,0	0
II-334C	+++	+++	57	-	85,9	0
II-534	++++	++	-	-	0	0
II-300A	++++	+	60	-	76,7	0
II-300B	+++	++	35	-	71,4	0
II-400A	+++	+	-	-	0	0
II-400B	+++	+	-	-	0	0
III-234A	+++	++	-	-	0	0
III-234B	++	++	-	-	0	0
II-234C	++++	++++	30	50	46,6	70,0
III-234D	+++	+	30	-	48,2	0
III-234E	+++	++	-	-	0	0
III-434A	++++	+++	-	-	0	0
III-434B	++++	+++	-	-	0	0
III-434C	+++	++	-	-	0	0
III-434D	++++	+++	-	-	0	0
III-434E	+++	+++	33	39	69,7	71,8
III-434F	+++	++	30	-	70,0	0
III-200A	++	+	-	-	0	0
III-200B	+++	++	-	-	0	0
III-200C	+++	+++	33	-	40,6	0
III-200D	+++	+	18	-	32,2	0
III-200E	+++	+	-	-	0	0
III-200F	+++	+	-	-	0	0
III-200G	+++	++	-	-	0	0
III-300A	++++	+++	-	-	0	0
III-400A	+++	+	-	-	0	0
III-400B	+++	++	-	-	0	0

Tamaño de colonias (mm): + (<5); ++ (>5-9); +++ (>9-12); ++++ (>12-16)

5.12. Identificación de esponjas

Las esponjas recolectadas tanto en Pucusana como en San Juan de Marcona compartieron cierta similitud externa, tales como tamaño y forma; sin embargo, el color y textura del cuerpo fue un carácter distintivo (Tabla 25). Los especímenes de Pucusana mostraron un color amarillo-naranja intenso, en cambio los de Marcona fueron tanto de color amarillo-naranja como morado-violáceo. Los análisis de sus características morfológicas externas, internas y observación de sus espículas (Córdor y Francia, 2022) permitieron ser identificadas como miembros de la clase Demospongiae, género *Hymeniacidon* (colectadas en Pucusana y Marcona) y *Haliclona* (colectadas solo en Marcona). Ambos especímenes se muestran en la Figura 43, Figura 44 y Figura 45.

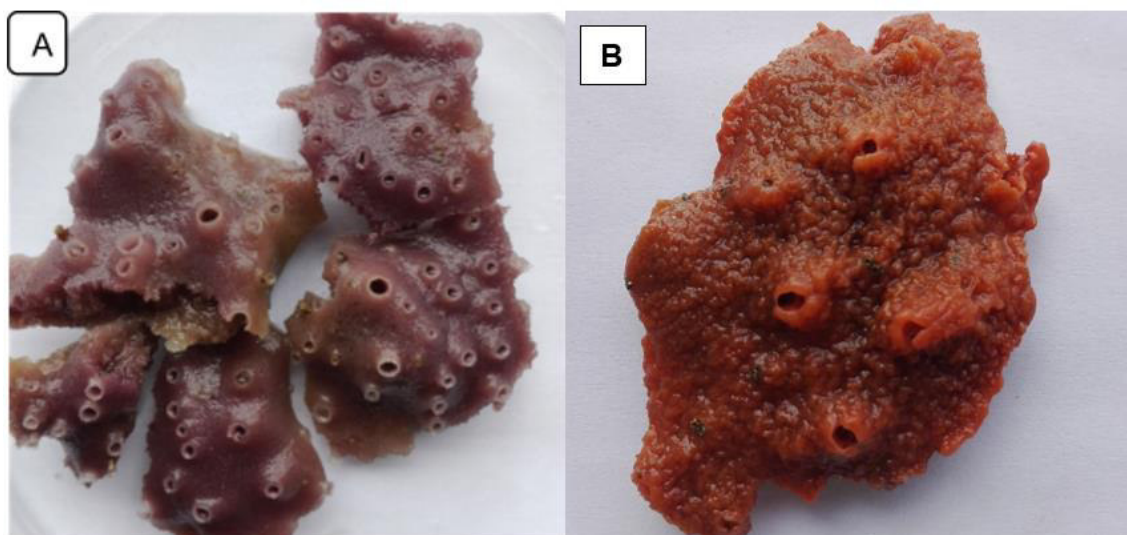


Figura 43. Esponjas marinas, género *Haliclona* sp. (A). y *Hymeniacidon* sp. (B).

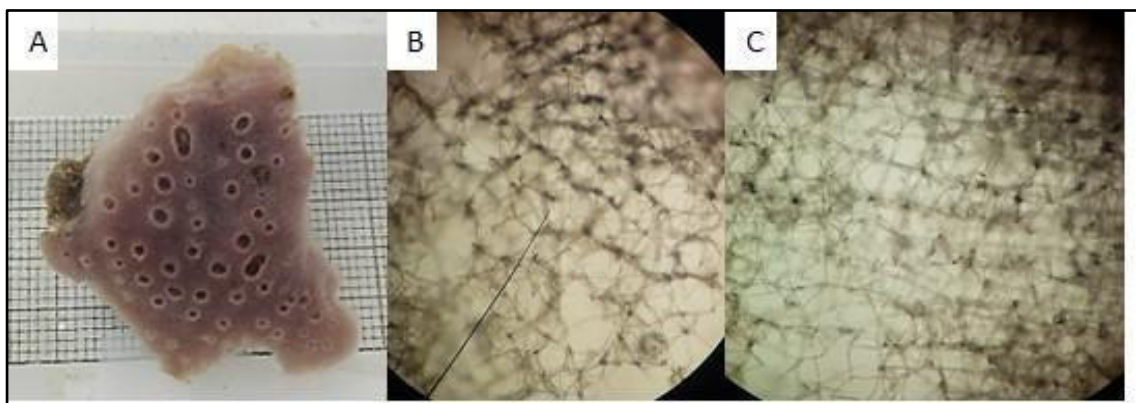


Figura 44. *Haliclona* sp. A. Especimen fijado. B. Esqueleto ectosomal isodictial. C. Esqueleto coanosomal anisotrópico.

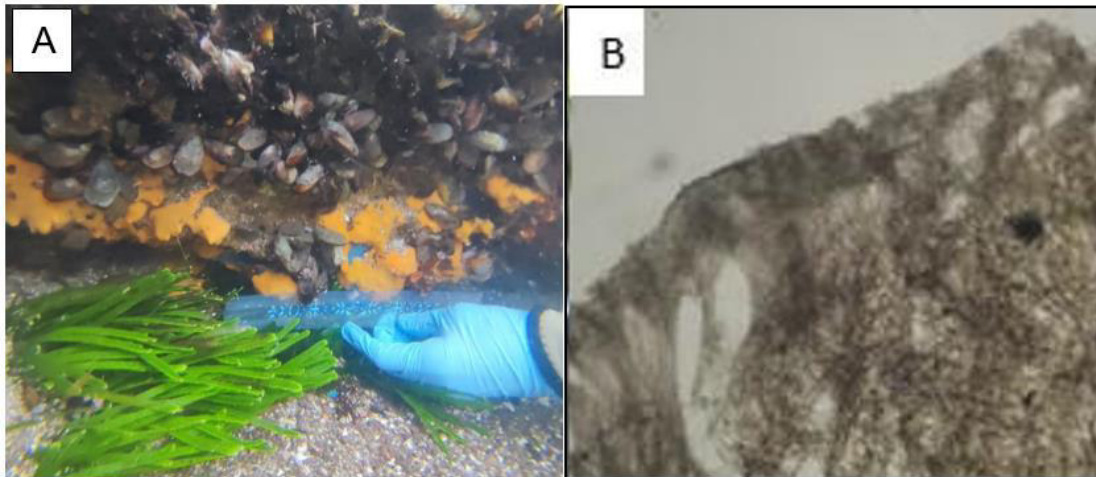


Figura 45. *Hymeniacion* sp. **A.** Espécimen bajo el agua. **B.** Corte transversal mostrando esqueleto ectosomal y esqueleto coanosomal con haces ascendentes.

Tabla 25. Descripción de las esponjas marinas colectadas en Pucusana (Lima) y San Juan de Marcona (Ica), 2018.

Género	Descripción	Esqueleto	Espícula
<i>Haliclona</i> sp.	Tamaño: 3.2 x 2.5 x 1.0 cm. Superficie ligeramente hispida y consistencia compresible. Ósculos terminales variando de redondo a ovalado con membrana visible. El color del espécimen en vivo es morado (Figura 43 A) y después de fijación, se vuelve blanco lechoso	Ectosoma isodictial con haces uniespiculares (Figura 44 B). Coanosoma anisotrópico con haces primarios multiespiculares y haces secundarios uniespiculares (Figura 44 C)	Oxeas ligeramente curvas, pudiendo ser delgadas y anchas, variando de 102.5 a 152.5 μm en longitud y 7.5 a 12.5 μm en ancho.
<i>Hymeniacion</i> sp.	Tamaño: 1.8 x 1.5 x 0.8 cm. Superficie lisa, poco áspera y de consistencia compresible. Ósculos dispersos. El color del espécimen vivo es naranja (Figura 43 B y Figura 45 A) y luego de fijado se torna blanco lechoso	Esqueleto ectosomal reticulado tangencial con bouquets. Esqueleto coanosomal sustentado por haces ascendentes formados por estilos hacia la superficie que en la parte más interna se vuelve confuso (Figura 45 B).	Estilos lisos, pudiendo ser rectos o curvos, variando de 130 a 390 μm en longitud y de 2.5 a 12.5 μm en ancho.

VI. DISCUSIÓN

El Perú tiene el privilegio de contar con una inmensa franja costera reconocida a nivel mundial por su valiosa riqueza de organismos que forman parte de su diversidad biológica marina. La costa peruana está en gran medida inexplorada en términos de diversidad microbiana y esto incluye al grupo de microorganismos conocidos como actinobacterias. La información científica sobre el microbiota actinobacterial en el ecosistema marino del litoral peruano es muy escasa, considerándose como uno de los hábitats poco explorados, a pesar de que el medio marino es considerado como una fuente promisoría de nuevos microorganismos con potencial para producir compuestos bioactivos (Prieto-Davó, 2016).

Esa carencia de información científica ha permitido iniciar estudios exploratorios de la presencia de Actinobacterias (actinomicetos), un grupo muy importante de bacterias de interés biotecnológico que forman parte del microbiota marino. En este estudio, se investigaron las actinobacterias asociadas con sedimentos marinos y esponjas recolectadas en varios puntos de muestreo de la costa central de Perú, mediante métodos dependientes del cultivo.

La investigación y la producción de los antibióticos a partir de recursos nuevos y emergentes tiene un papel primordial en el desarrollo de estrategias para abordar la amenaza para la salud mundial que representa la resistencia a los antibióticos (Tacconelli *et al.*, 2018). Por otro lado, en el mundo contemporáneo, la aparición de nuevas enfermedades, el surgimiento de patógenos humanos resistentes a múltiples fármacos, la reaparición de enfermedades previamente controladas y la insuficiencia de las medidas terapéuticas para controlar dichas enfermedades emergentes es hoy en día un problema de salud mundial. Los actinomicetos debido a su potencialidad para producir una serie de antimicrobianos se han convertido en el centro de interés para contrarrestar la presencia de patógenos humanos drogorresistentes causantes de estas nuevas enfermedades. Por lo tanto, el aislamiento de actinomicetos de hábitats poco explorados se ha popularizado para suplir la necesidad de nuevos antimicrobianos (Sengupta *et al.*, 2015, Olga, 2018).

Esta problemática de salud pública no es ajena a nuestra realidad, la aparición cada vez mayor de formas multidrogorresistentes de patógenos humanos propiciaron que la comunidad científica de los últimos años preste mayor atención a la potencialidad bioactiva de los microorganismos presentes en ecosistemas escasamente explorados, tales como el ambiente marino del litoral peruano. Una revisión exhaustiva de la literatura científica indicó que existe escasa información sobre el aislamiento y detección

de actinomicetos de litoral central de la costa peruana. En consecuencia, a través del presente estudio prospectivo se han realizado investigaciones orientados al aislamiento, selección e identificación de actinomicetos marinos de estas regiones para contribuir en el conocimiento de cepas potenciales de aplicación en salud pública.

6.1. Aislamiento y caracterización de colonias de actinomicetos de sedimento marino

Poco se sabe sobre la diversidad de actinomicetos en los sedimentos marinos costeros, que es un recurso inagotable que no ha sido explotado adecuadamente (Chacko *et al.*, 2012; Karthik *et al.*, 2010). A través del presente estudio, se logró aislar un total de 62 actinomicetos marinos a partir de las muestras de sedimento colectados en diversos puntos de muestreo de la costa central del país. Para ello, se utilizó dos métodos y dos medios de aislamiento. En relación con los métodos y medios de aislamiento se ha considerado como procedimientos selectivos debido que éstos permiten promover el crecimiento de actinobacterias y evitar el crecimiento del microbiota acompañante en las placas de cultivo. Estos procedimientos similares fueron también informados por otros investigadores como Pisano *et al.* (1986); Undabarrena *et al.* (2016) y Kamjam *et al.* (2017). La aplicación de pretratamientos y/o la presencia de sustancias antimicrobianas en los medios de aislamiento influyen en el número de actinomicetos recuperados (Bull & Stach 2007).

En el presente estudio se utilizaron Agar Czapeck y Agar Marino como medios de cultivo; en ambos casos se utilizaron en su preparación 75 % de agua marina y 25 % de agua destilada. Por otro lado, de las muestras de sedimento procesadas por el método I (calor húmedo) y sembradas en Agar Czapeck se recuperaron colonias de actinomicetos en 50% de las placas totales sembradas; en cambio, de las mismas muestras, pero sembradas en Agar Marino (preparado con agua de mar) se llegó a recuperar hasta el 75% de crecimiento de colonias de actinomicetos. Por otro lado, de las muestras tratadas por el método II (calor seco) y luego cultivadas en el medio Agar Czapeck solamente el 12% tuvo crecimiento favorable a actinomicetos, en cambio, en el Agar Marino alcanzó hasta el 25% de crecimiento. Sin duda, el tratamiento de la muestra por calor húmedo fue más eficaz para impedir el crecimiento de la carga microbiana que acompaña a las muestras, ya que en la mayoría de los cultivos se obtuvo pureza entre las colonias de actinomicetos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pisano *et al.* (1986), quienes señalan que además del calor también optaron por tratamientos con fenol y su cultivo en Agar Quitina. Sin duda, el método del calor húmedo mostró ser más efectivos para aislar actinomicetos, lo que es consistente

con la observación de Pisano *et al.* (1992) quienes señalaron que el pretratamiento térmico de 55 °C es una buena alternativa para el aislamiento de actinomicetos. Aunque Bredholt *et al.* (2008) encontraron que el calentamiento y la exposición de las muestras al fenol aumentaban el número de actinomicetos formadores de micelio. Por otro lado, existe información de otros trabajos, quienes señalan que los contaminantes bacterianos como *Pseudomonas* crecían más rápido e inhibían el crecimiento de actinomicetos; por ello, fue necesario inhibir el crecimiento de estos microorganismos no deseados calentando las muestras a 70 °C durante 20 minutos (Singh *et al.*, 2016). Asimismo, se informó que las esporas de actinomicetos normalmente pueden resistir la desecación y muestran una resistencia ligeramente mejor al calor seco o húmedo que otros microorganismos y por lo tanto, el tratamiento térmico y las diluciones en serie de las muestras redujeron el crecimiento de microorganismos no deseados (Mahejbin *et al.*, 2019).

Según los medios de aislamiento utilizados en este estudio, el uso de Agar Marino parece ser la mejor opción para aislar actinomicetos de ambientes marinos, ya que se logró recuperar mayor cantidad de colonias, aunque de menor tamaño en un aislamiento primario. Este resultado es compatible con otros trabajos quienes revelaron que los medios de cultivo baja concentración de nutrientes eran más eficientes que los medios enriquecidos, en especial durante el aislamiento primario (Jensen *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005).

Igualmente, la profundidad del lugar de muestreo influye en el número de actinomicetos recuperados. En el presente trabajo, el muestreo se realizó de 15 y 34 m de profundidad, y ocasionalmente a 100 m. Se encontró que el número de aislamientos disminuyó en forma proporcional con la profundidad, habiéndose obtenido el mayor número de aislamientos de 15 y 34 m tanto de la Bahía de Independencia así como de Ancón. Una observación similar fue reportada previamente por (Jensen *et al.* 1991).

El color que toma el micelio aéreo fue considerado desde hace buen tiempo como un carácter importante para agrupar actinomicetos de origen terrestre (Pridham y Tresner, 1974). Sin embargo, los actinomicetos aislados de sedimentos marinos registrados en trabajos previos fueron morfológicamente distintos; esto es según el color de la masa de esporas, el micelio del sustrato, la pigmentación, la morfología de la cadena de esporas, etc. En el presente trabajo, fue posible la observación de diversos colores de colonias, siendo las más frecuentes colonias blancas sin pigmentación aparente en su superficie (37,1 %), colonias grisáceas (29,03 %), colonias con pigmentaciones intermedias como blanco-rosáceas (16,12 %), cremas (12,9 %) y blanco-amarillentas

(4,83 %). Igualmente, con frecuencia se observaron colonias con superficie crateriforme y corrugada con anillos concéntricos en los bordes (Figura 16, Figura 17). Estos resultados fueron también similares en otros trabajos de actinomicetos marinos (Sujatha *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2008; Baskaran *et al.*, 2011). Tal como indican Augustine *et al.* (2013) quienes describen que los actinomicetos aislados de la Bahía de Bengala presentaron colonias blancas (58,26 %), luego grises (20,8 %), amarillas (8,7 %), verdes (8,26 %) y rojas o rosadas claras (4 %). Las cepas de actinomicetos de la costa del Pacífico sur de Filipinas presentaron también la mayoría (54 %) colonias de la serie blanco-grisácea (Parthasarathi *et al.*, 2012). Igualmente, se informó que los actinomicetos marinos (miceliales) pigmentados de color gris y blanco eran predominantes en la Bahía de Bengala (Ramesh & Mathivanan, 2009), lo que también se observó en el presente estudio (Figura 15).

Por otro lado, los métodos tradicionales, como la observación morfológica de la cadena de esporas, la ornamentación de las esporas, observados generalmente con la ayuda del microscopio óptico y/o con microscopio electrónico de barrido, se consideran herramientas valiosas en la caracterización de actinomicetos, en especial la morfología de la cadena de esporas se considera una de las características diferenciales en la identificación de colonias de *Streptomyces*; ya que se ha informado que la mayoría de los aislamientos de este género producen micelios aéreos con cadenas de esporas en espiral enrolladas (Das *et al.*, 2008; Chacko *et al.*, 2012) seguido de la morfología de las esporas rectiflexibles. Los resultados del presente estudio también coinciden con esta descripción de cadena de esporas en espiral en la mayoría de los actinomicetos marinos identificados finalmente como miembros del género *Streptomyces*.

Los sedimentos marinos albergan una gran diversidad de actinobacterias cultivables (Bredholdt *et al.* 2008; Gontang *et al.* 2007; Claverías *et al.* 2015). En el presente trabajo, el análisis de la diversidad filogenética de las principales cepas activas mostró que los aislados pertenecían al género *Streptomyces*, las mismas que se encuentran muy ampliamente distribuidos en ambientes marinos a nivel mundial (Claverías *et al.* 2015; Jose & Jha 2016). Por otro lado, con relación a los géneros de actinomicetos predominantes aislados de sedimento marino hay variabilidad de reportes. Este es el caso de Prieto-Davó *et al.* (2016), quienes identificaron 24 géneros de actinobacterias en sedimentos marinos del archipiélago de Madeira (Portugal) y concluyeron que *Streptomyces*, *Actinomadura* y *Micromonospora* eran los géneros más abundantes. Sin embargo, otros autores indicaron que las actinobacterias de la familia Micromonosporaceae se encuentran entre las bacterias más dominantes en los sedimentos marinos (Jensen *et al.*, 1991; Gontang *et al.*, 2007). Igualmente, en los

sedimentos recolectados en el Mar del Norte y la Bahía de Chesapeake (Estados Unidos de Norteamérica) se reportaron *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* y *Microbispora* (Takizawa *et al.*, 1993). Asimismo, se ha reportado que los géneros *Micromonospora* y *Streptomyces* fueron los más dominantes en sedimentos recolectados en el fiordo de Trondheim, Noruega (Bredholt *et al.*, 2008). Duncan *et al.* (2014, 2015) mostraron que las actinobacterias de los géneros *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia* y *Streptomyces* fueron predominantes en los sedimentos marinos en New Brunswick, Canadá.

Gozari *et al.* (2019) aislaron 168 actinomicetos de 14 muestras de sedimentos del norte del mar de Omán. Analizaron entre cuatro medios y dos tratamientos, el medio agar glucosa arginina (18 %) y el tratamiento térmico (28,3 %) mostraron una tasa máxima de aislamiento de actinomicetos. La caracterización previa reveló que los miembros de Streptomycetaceae estaban ampliamente distribuidos (66 %) en la mayoría de las muestras, seguidos de Micromonosporaceae (14 %), Nocardiaceae (6 %) y Pseudonocardiaceae (4 %). Además, determinaron que el 23,8 % de los aislados que impidieron que al menos una de las cepas microbianas de prueba se desarrollara, pertenecían a la familia Streptomycetaceae.

Dos métodos utilizados en el tratamiento de muestras de sedimento marino del trabajo actual fueron también aplicados en otros estudios para inhibir el crecimiento de microorganismos irrelevantes y de esta manera promover la germinación de esporas de actinobacterias. Xiong *et al.* (2015) emplearon 7 pretratamientos diferentes, incluida la incubación a 60 °C durante 10 min (similar al nuestro) y la incorporación al medio de cultivo del ácido nalidíxico y cicloheximida. Utilizando medios selectivos como agar ABSM4, ISP3 y agar ácido húmico + vitamina (HVA), los autores lograron aislar 613 actinobacterias, de las cuales los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Kocuria*, *Nocardiopsis* y *Saccharomonospora* resultaron ser los más bioactivos. Por su parte Abdelfattah *et al.* (2016) pudieron recuperar especies bioactivas de *Streptomyces* y *Nocardiopsis* de sedimentos marinos recolectados en la costa del Mar Rojo, previa incubación en un baño de agua a 60 °C por 10 min y utilizando los medios HVA y SCN. Es destacable que estos aislados produzcan esporas que puedan resistir la exposición a 60 °C hasta por más de 10 minutos de incubación previa.

Se ha demostrado que el aislamiento de actinobacterias de diversas fuentes marinas es más eficiente cuando se utilizan medios de cultivo con bajas concentraciones de nutrientes, que simulan mejor el ambiente marino natural y evitan el desarrollo de microorganismos de rápido crecimiento (Hames-Kocabas & Uzel, 2012; Gontang *et al.*,

2007; Jensen *et al.*, 2005). Este es el caso del Agar Marino utilizado en el presente estudio, el cual fue formulado únicamente con nutrientes pobres en C y N preparados con agua de mar añeja obtenidos del mismo lugar de colecta de sedimentos. Jensen *et al.* (2005) utilizaron este medio para recuperar de un sedimento marino recolectado en la isla de Guam un gran número de aislados de actinobacterias dependientes de sal pertenecientes a los géneros *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Actinomadura*. Asimismo, Gotang *et al.* (2007) utilizaron un medio oligotrófico compuesto únicamente por agua de mar y agar para cultivar bacterias Gram positivas a partir de sedimentos recolectados en la República de Palau, siendo el 70% de los aislados pertenecientes a Actinobacterias y Firmicutes. Otros medios selectivos como SCN y M3 también se han utilizado con éxito para el aislamiento de actinobacterias. En ese sentido, Maldonado *et al.* (2005) emplearon 6 medios de cultivo selectivos, incluidos M3 y SCN, para el aislamiento de actinobacterias a partir de sedimentos marinos recolectados de diferentes ubicaciones (Fosa de Japón, Cuenca Canaria y fiordos de Noruega), pudieron obtener una gran cantidad de aislamientos en los medios M3 y SCN, siendo éstos pertenecientes a diversos géneros (*Actinomadura*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Pseudonocardia*, *Mycobacterium*, *Nocardiopsis*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*, *Nonomuraea*, *Verrucosipora* y *Williamsia*).

Los métodos de tratamiento utilizados en el presente trabajo (calor húmedo y calor seco) y los medios empleados (Agar Marino y Agar Czapeck y opcionalmente Agar Almidón Caseína) también permitieron el aislamiento de géneros microbianos distintos de las actinobacterias (no reportados en el presente informe). En este sentido, se logró aislar dos cepas Gram positivas, formadoras de endosporas, la primera perteneciente al género *Virgibacillus* (de la familia Bacillaceae) y la segunda, una cepa Gram negativa del género *Alcanivorax* sp. (familia Alcanivoraceae). Según reportes consultados, ambos géneros tienen como hábitats naturales los ambientes salinos propios de ecosistemas marinos (Xu *et al.*, 2018; Jamal & Satheesh, 2022). *Alcanivorax* ocupa diferentes profundidades y hábitats, ya sea de vida libre o en asociación con otros organismos marinos, encontrándose también en aguas y sedimentos superficiales y profundas (Lai *et al.*, 2016; Karthick & Mohanraju, 2018; Liao *et al.*, 2020). No obstante, no hay muchos informes sobre su presencia en asociación con esponjas marinas (Indraningrat *et al.*, 2019; Jamal & Satheesh, 2022).

Abdelmohsen *et al.* (2010), en el aislamiento de actinomicetos marinos utilizaron ocho medios diferentes (M1, ISP 2, medio oligotrófico – OLIGO, M1 plus, agar de aislamiento de actinomicetos – AIA, agar marino – MA, agar glicerol asparagina - GAA y agar R2A). Todos estos medios se complementaron con adición de cicloheximida (100 µg/mL),

nistatina (25 µg/mL) y ácido nalidíxico (25 µg/mL) filtradas en membranas de porosidad 0,2 µm para facilitar el aislamiento de actinobacterias con gran éxito. La cicloheximida y la nistatina inhiben el crecimiento de hongos, mientras que el ácido nalidíxico inhibe muchas bacterias gramnegativas de rápido crecimiento (Webster *et al.*, 2001).

Los antifúngicos señalados y el ácido nalidíxico fueron también utilizados con gran éxito para el aislamiento de actinobacterias en el presente trabajo, siendo este último de mucha utilidad por ser un antibiótico de amplio espectro, pero sobre todo efectivo contra bacterias Gram negativas. Este antibiótico es de uso general en estudios sobre actinobacterias, prácticamente aceptado junto con estreptomina por la comunidad científica dedicado al aislamiento de este grupo bacteriano, aunque existen ciertos géneros que resultan siendo resistentes.

Finalmente, el aislamiento exitoso de actinomicetos de fuentes marinas requiere de ciertas estrategias y la aplicación de parámetros de cultivo y conocimientos previos de factores ambientales incluido el pH; Se deberá comprender y controlar la temperatura del cultivo, el oxígeno y los requisitos nutricionales. Los medios de crecimiento normalmente deben tener valores osmóticos similares a los del agua de mar, ya que el sodio (Na⁺) es uno de los componentes más críticos del medio y esencial para el desarrollo de microorganismos marinos como *Salinispora* spp. Además, diferentes fuentes de carbono (es decir, almidón soluble; glucosa, dextrosa, maltosa, trehalosa, manitol, rafinosa, fucosa, quitina, glicerol y harina de avena) y fuentes combinadas de carbono y nitrógeno (es decir, peptona; extracto de levadura, caseína, extracto de malta, extracto de carne y triptona) deben agregarse al medio de aislamiento. Entre otras estrategias, recomiendan adicionar extractos de sedimento, extracto de esponjas y agua salada genuina, ya sea solos o como suplementos para simular las condiciones naturales de crecimiento marino (Subramani & Sipkema, 2019). Los actinomicetos marinos se han aislado de preferencia mediante diversos procedimientos de pretratamiento; siendo el más común que la muestra ambiental se seque dentro de una cabina de flujo laminar de aire caliente y luego diluir con agua de mar o solución salina antes de calentarla (Siro *et al.*, 2022).

6.2. Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de sedimento marino

El aumento global de infecciones causadas por bacilos Gramnegativos multirresistentes (BGN-MR), lo cual incluye a los carbapenemes, supone uno de los grandes retos actuales en materia de sanidad. Esto incluye Enterobacterales productores de β-lactamasas de espectro extendido, productoras de AmpC desreprimida o

Enterobacteriales productores de carbapenemasas, así como BGN-MR no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*. En *Pseudomonas aeruginosa* predominan otros mecanismos de resistencias diferentes a las β -lactamasas tales como bombas de expulsión o pérdida de porinas. *A. baumannii* presenta con frecuencia varios de estos mecanismos de resistencia. La mortalidad es elevada especialmente si el tratamiento es inadecuado o empírico (Garnacho-Montero y Amaya-Villar, 2022).

La aparición de resistencia a los antimicrobianos frente a fármacos comunes es hoy en día un grave problema global en la salud pública. La búsqueda de nuevos fármacos activos contra bacterias multirresistentes (MDR) es un área principal de investigaciones que intentan restringir la amenaza de resistencia a los antimicrobianos (Alanis, 2005). Los productos naturales son fuentes infinitas de moléculas bioactivas con actividades biológicas útiles (Cragg, 2013). El medio marino, que cubre casi el 70% de la superficie terrestre, contiene muchos microorganismos capaces de producir agentes bioactivos (Sathish & Kokati, 2012). Las actinobacterias marinas son en la actualidad ampliamente reconocidos como productoras de diversos metabolitos secundarios (Procopio *et al.*, 2012). El género *Streptomyces* es reconocido como el principal productor de metabolitos funcionales con diversas actividades farmacéuticas (Naine *et al.*, 2015). En resumen, las actinobacterias marinas son una fuente reconocida de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana (Duncan *et al.*, 2015; Hassan & Shaikh, 2017).

Para delinear la capacidad de los actinomicetos aislados de sedimento marino de la costa central de Perú como productores de metabolitos antimicrobianos se utilizaron enfoques cualitativos y cuantitativos como estrategias de detección de antibacterianos. En el presente trabajo, los aislados fueron examinados para determinar su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas drogorresistentes de origen clínico, tanto Gram positivas como Gram negativas. Nuestros resultados señalan que 23 aislados mostraron actividad al menos contra una bacteria patógena Gram positiva (*S. aureus* ATCC 43300 meticilino resistente; *S. aureus* MDR (cepa peruana); *E. faecalis* ATCC 51299 vancomicina resistente y *E. faecalis* ATCC 29212 vancomicina sensible). Asimismo, cepas seleccionadas y evaluados por su respuesta antimicrobiana frente a cepas MDR Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* cepa 657, *Pseudomonas aeruginosa* 149, *Pseudomonas aeruginosa* 303, *Escherichia coli* 302, *Enterobacter aerogenes* 171, *Klebsiella* 184 y *Acinetobacter* 134), la mayoría ha respondido favorablemente para inhibir a estos patógenos drogorresistentes de origen hospitalario.

Numerosos trabajos sobre el tamizaje de la actividad antimicrobiana de actinomicetos han demostrado que ciertos patógenos bacterianos estándar, así como algunos hongos levaduriformes en especial del género *Candida* son altamente sensibles a la acción de los actinomicetos. En este sentido, nuestros resultados ratifican tal enunciado, debido que la gran mayoría (72,58%) tuvieron actividad antimicrobiana, y tan solo 27,42 % no mostraron dicha actividad. Por otro lado, todos los patógenos de origen clínico fueron susceptibles al menos a un actinomiceto. Este tipo de resultados son recurrentes en investigaciones realizados tanto con patógenos de origen clínico Gram positivos como *S. aureus* MR, *Enterococcus* VR y Gram negativos como *P. aeruginosa*, cepas ampliamente reconocidas como drogorresistentes en todos los ámbitos.

Respecto a la actividad antibacteriana de los actinomicetos contra las cepas estándar como *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (meticilino resistente), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (vancomicina resistente) y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (vancomicina sensible) los resultados de antibiosis son tan evidentes que mostraron resultados contundentes, cuyos halos de inhibición comprende desde 11 hasta 77 mm de diámetro, y potenciales de inhibición que alcanzan sorprendentes porcentajes de inhibición siendo las cepas M11-121, M11-116 y M10-77 las más efectivas con 92, 85,7 y 85,2% respectivamente frente a *S. aureus* ATCC 43300 (meticilino resistente). Resultados similares son mostrados en otros reportes de actinomicetos frente a otros Gram positivos MDR como *E. faecalis* VR (Bengtsson *et al.*, 2018)

Norouzi *et al.*, (2018), considerando el problema de la resistencia a los antimicrobianos, investigaron la bioactividad de actinobacterias aislados del sedimento del Mar Caspio contra patógenos resistentes a múltiples fármacos (MDR). Con ese objetivo, evaluaron 21 actinomicetos logrando caracterizar tres cepas (MN2, MN39 y MN40) productoras de agentes antimicrobianos con amplio espectro de actividad. Fueron identificadas genéticamente mediante análisis de ARNr 16S como miembros del género *Streptomyces*. Los extractos obtenidos con acetato de etilo resultaron eficaces contra algunas bacterias MDR, especialmente *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE). Además, las cepas mostraron una notable actividad anti-*Vibrio*, así como capacidad de producción de enzimas extracelulares, incluidas amilasa y proteasa.

En la actualidad se dispone de reportes sobre actinomicetos marinos con actividad anti-MRSA; siendo éstos por lo general cepas ambientales de *Streptomyces*. Son pocos los investigadores quienes informan sobre la actividad anti-MRSA de actinomicetos aislados de muestras de sedimento marino. Este es el caso de *Streptomyces* aislado de

la región costera que inhibe el patógeno MRSA (Kemung *et al.*, 2018). Resultados similares informan Asnani *et al.* (2020) sobre actinomicetos aislados de sedimentos de manglares con alta actividad anti-MRSA en Segara Anakan Cilacap, Indonesia. *S. glauciniger* NBRC 100913 y *S. griseoplanus* NRRL-ISP 5009 son dos cepas que mostraron actividad anti-MRSA contra MRSA 43300 y un aislado clínico de MRSA (Ahmed *et al.*, 2020). Igualmente, se informa sobre la cepa de *Streptomyces* MUSC 125 aislada del suelo de manglares que mostró actividades antibiopelículas, antioxidante y anti-MRSA (Kemung *et al.*, 2020). De la misma forma, los actinomicetos aislados de muestras de sedimentos de manglares marinos mostraron su eficacia contra *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (Kadaikunnan *et al.*, 2021; Elias *et al.*, 2022). En consecuencia, existen importantes reportes sobre actinomicetos aislados de ambientes marinos con clara actividad anti-MRSA, siendo la mayoría especies pertenecientes al género *Streptomyces* aislados de sedimento marino, los cuales refuerzan los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Una contribución de los últimos años es el trabajo desarrollado por Tenebro *et al.* (2021), quienes reportan el predominio de *Streptomyces* aislados de sedimento marino del centro-oeste de Filipinas. De 2212 cepas de actinomicetos aisladas de 11 lugares geográficos, 92 cepas exhibieron actividades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* resistentes a múltiples fármacos. La mayoría mostraron actividades antibacterianas contra *S. aureus* ATCC BAA-44, un clon de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) con resistencia conocida contra 18 antibióticos comerciales (Sabido *et al.*, 2020). En tanto, a pesar de que se esperaba una susceptibilidad baja o moderada frente a patógenos gramnegativos las cepas activas de *Streptomyces* del sedimento marino han mostrado una actividad prometedora frente a *P. aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Analizando en conjunto la actividad antimicrobiana de los actinomicetos obtenidos de sedimento de mar de la costa central de Perú contra patógenos MDR Gram positivos como Gram negativos se deduce que las cepas testigo Gram positiva resultan siendo de mayor sensibilidad en comparación de los Gram negativos, tal como se puede apreciar en las tablas y figuras correspondientes. Se observó que los patógenos Gram negativos eran más resistentes en comparación con los patógenos Gram positivos. Esto podría atribuirse a la presencia de lipopolisacáridos en la membrana externa de las bacterias Gram negativas como unidad estructural principal, en cambio las bacterias Gram positivas carecen de lipopolisacárido como barrera protectora y se vuelven susceptibles a los metabolitos producidos por los actinomicetos. Por lo tanto, es probable que esta diferencia se deba a la actividad específica de las moléculas

bioactivas secretadas por los actinomicetos contra las bacterias Gram positivas, especialmente *S. aureus* MR y *Enterococcus* VR.

Una explicación que complementa la actividad antimicrobiana selectiva que presentan los actinomicetos frente a patógenos MDR es que existen mecanismos que favorecen al patógeno ser menos sensible a la acción de antimicrobianos fármacos. Estas se pueden agrupar en 4 categorías: (i) modificación del objetivo del fármaco, (ii) limitación de la absorción del fármaco, (iii) activación del eflujo del fármaco y (iv) inactivación del fármaco. Las bacterias Gram negativas son capaces de utilizar los cuatro mecanismos de resistencia; en cambio las bacterias Gram positivas, debido a estas diferencias estructurales, pueden limitar con menos frecuencia la absorción de fármacos y no pueden inducir ciertos tipos de mecanismos de salida de fármacos (Reygaert, 2018).

6.3. Actividad anti-*Candida* de actinomicetos aislados de sedimento marino

Los actinomicetos son bacterias filamentosas grampositivas conocidas por su capacidad para crear una gran variedad de compuestos bioactivos, incluidos metabolitos antifúngicos (Dhakal *et al.*, 2020). Estas bacterias se encuentran comúnmente en el suelo, pero también pueden colonizar otros nichos como el agua, las plantas y los animales. Los géneros que producen las biomoléculas de mayor importancia comercial son *Streptomyces*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* y *Actinoplanes* (Solanki *et al.*, 2008; El-Tarabily *et al.*, 2020). Los compuestos antifúngicos de *Streptomyces* son principalmente polienos, macrólidos y péptidos, que actúan con fuerza contra una amplia gama de hongos patógenos (Malla *et al.*, 2021).

Las infecciones causadas por *Candida* se encuentra en un estado de aumento constante desde las últimas tres décadas; aunque los antifúngicos como el clotrimazol y el fluconazol están ampliamente disponibles; sin embargo, debido a la resistencia a estos medicamentos y a los diversos efectos secundarios, existe la necesidad de recurrir a moléculas anti-*Candida* segura (Vikrant *et al.*, 2015). Los sedimentos marinos, en especial de los manglares son un recurso repleto de microorganismos y debido al entorno fisicoquímico dinámico, dichos microorganismos que sobreviven en esta área están dotados de biomoléculas con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, en especial con actividad antifúngica (Nurfathiah *et al.*, 2014; Gunasekaran & Thangavel, 2013).

El presente trabajo resalta la actividad anti-*Candida* de 62 actinomicetos aislados de sedimento marino contra siete cepas de *Candida albicans* procedentes de pacientes ambulatorios. Las pruebas *in vitro* de antagonismo contra cepas de *Candida albicans* de

origen clínico señalan que 86,5% (45) mostraron actividad inhibitoria; de ellas, el 55,75% mostraron actividad inhibitoria contra *C. albicans* C1415, 45% contra *C. albicans* B4606 y 36% contra *C. albicans* B4604. Sin embargo, el 28% mostraron actividad moderada contra *C. albicans* C1656 y solamente el 14% contra *C. albicans* C157.

De las 62 cepas de actinomicetos marinos que se estudiaron por su actividad anti-*Candida*, las cepas III 434 C y M11-125 fueron las más bioactivas que llegaron a generar los halos de inhibición de mayor tamaño, siendo los máximos valores de 58,5 y 52,5 mm de diámetro respectivamente frente a *C. albicans* C 1415. Por su parte la cepa MC 300 mostró actividad inhibitoria frente a 6 de los 7 miembros de *Candida albicans* probadas en el presente experimento. La cepa M10 77 es la tercera cepa de actinomiceto en importancia que mostró actividad anti-*Candida*, aunque los halos de actividad fueron algo menores que en los casos anteriores. Igualmente, se resalta la actividad anti-*Candida* de otras cepas de actinomicetos que muestran actividad considerable tanto en cultivos directos como del extracto crudo obtenido por solventes (Tabla 20 y las Figuras 32 y 33).

Los resultados de esta investigación difieren de otros reportes; este es el caso de Zheng *et al.*, (2000), quienes señalaron que sus cultivos de actinomicetos marinos con actividad anti-*Candida* produjeron halos de inhibición de hasta 10 mm de diámetro contra *Candida albicans* AS2.538 y *Saccharomyces cerevisiae* 9763; en cambio, en nuestro caso los halos de actividad contra *Candida albicans* de origen clínico llegaron a superar 35 mm de diámetro como promedio. Otro interesante dato proviene del trabajo de Sharifi & Bipinraj (2019), quienes informan el aislamiento e identificación de 20 actinomicetos aislados del sedimento de manglares de Khargar, Navi Mumbai – India y su actividad antagonista contra especies de *Candida albicans* resistentes a medicamentos, entre los cuales se encontró que la cepa designada como MB e identificada como *Streptomyces viridocromogenes* inhibía todos los cultivos de *Candida* patógenas analizadas. Además, el cultivo de MB mostró actividad máxima después de una incubación de 48 a 72 h, pH de 6,2 y temperatura de 30°C, siendo en este sentido similar a nuestro estudio. Asimismo, los autores señalaron que la actividad del extracto crudo se inactivaba mediante tratamiento térmico, pero resistía a la proteinasa K, lo que indicaría que el compuesto pudo haber sido de naturaleza antibiótica.

Datos muy interesantes fueron reportados por Nandhini *et al.*, (2015), quienes aislaron 40 cepas actinomicetales de sedimento de mar colectados en la costa de Tamil Nadu (India), seleccionaron 15 sobre la base de su actividad antifúngica, pero sólo una mostró actividad de amplio espectro contra los seis hongos patógenos, pero de mayor actividad

contra *Candida albicans*. La cepa fue identificada como *Streptomyces rubralavendulae* (HQ234765) basándose en la secuenciación morfológica y parcial del gen 16S rRNA. El extracto crudo obtenido con acetato de etilo fue purificado e identificado como 2-isopropil-5-metil-1-heptanol y eicosano mediante el método GC-MS, sugiriendo que el *Streptomyces* aislado del ambiente marino podría usarse para el tratamiento de infecciones fúngicas.

Otro dato interesante proviene de Ayari *et al.*, (2016), quienes a partir de muestras de sedimento marino del lago Oubeira, Argelia, aislaron y seleccionaron un actinomiceto cepa AA13 con actividades contra *Candida albicans*. Las propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas y la secuenciación del gen RNAr 16S sugirieron que era una nueva especie del género *Streptomyces*. Estudios complementarios indicaron que su actividad antifúngica dependía de la influencia de los compuestos nutricionales y condiciones de cultivo, determinando mayor biomasa y mejor actividad utilizando glicerol y peptona como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, con pH 7,0 y 30° C de temperatura de incubación (concordante con nuestros estudios). Además, los extractos de mayor rendimiento se obtenían con acetato de etilo, habiendo determinado con HPLC y espectroscopía infrarroja la presencia de compuestos de tres picos con anillos aromáticos sustituidos con cadenas alifáticas. Adicionalmente, se determinó que el compuesto anti-*Candida* era extracelular y mostró máximo crecimiento y actividad cuando se cultivó a 30 °C y pH 6 después de 72 h en el medio YMB y la actividad del cultivo era estable hasta pH 8,5 y temperatura de 55°C.

Moaz *et al.*, (2019) a partir de sedimento marino recolectados en la costa del Mar Rojo – Hurghada y el Golfo de Suez lograron aislar 16 actinomicetos antagonistas a 7 bacterias patógenas y a *Candida. Albicans* ATCC 10231. Entre los 16 aislamientos, 14 (87,5%) mostraron actividad antimicrobiana contra la mayoría de los patógenos analizados. El aislado más potente se identificó mediante análisis de secuencia de ARNr 16S como *Streptomyces* sp. (*Streptomyces* sp. MK388207). De acuerdo con las condiciones de cultivo para producir antimicrobianos contra *C. albicans* ATCC 10231 se logró optimizar a un aumento de 1,4 veces en la actividad antimicrobiana. El extracto de acetato de etilo sometido a espectrometría de masas por cromatografía gas-líquido (GC MS) reveló la presencia de seis fracciones cuyo componente principal era fenol, 2,4-bis (1,1 dimetiletilo).

Otros trabajos similares al presente han revelado que las Actinobacterias en general y el género *Streptomyces* en particular sean los principales productores de metabolitos secundarios bioactivos que exhibían con mayor frecuencia actividades contra hongos y

bacterias Gram positivas que contra bacterias Gram negativas (Duncan *et al.*, 2015; Hassan & Shaikh, 2017; Xiong *et al.*, 2015). Son ejemplos de algunos metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces* marinos con actividad contra *C. albicans* incluyen isoikarugamicina, una nueva macrolactama de ácido tetrámico policíclico que es efectiva a un valor de CIM de 2-4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Lacret *et al.*, 2014), daramidas A y B, que exhiben valores de CIM de 62,5 y 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Asolkar *et al.*, 2006), 4-fenil-1-naftil-fenilacetamida, que tiene una fuerte actividad particularmente contra *C. albicans* (Dhanasekaran *et al.*, 2008). La comparación de los valores de CIM de los compuestos citados con los hallazgos de este estudio sugiere que los extractos crudos de las cepas aisladas de *Streptomyces* pueden tener un alto potencial de bioactividad, especialmente dado que estos valores fueron probados con extractos crudos y no con compuestos puros, como es el caso de los compuestos indicados anteriormente. En el futuro, será importante investigar si pueden estar presentes nuevos metabolitos bioactivos en estos extractos.

En los últimos años, se reportaron investigaciones orientados a la búsqueda de nuevos metabolitos provenientes de *Streptomyces* aislados de sedimento marino con actividad anti-*Candida albicans*. *Streptomyces* OUCT16-23 aislado de sedimento de aguas profundas ha sido reportado como productor de macrólidos con actividad antifúngica contra *C. albicans* (Bao *et al.*, 2022). *Streptomyces* sp. ZZ446 aislada de suelo costero produce diferentes compuestos, como estreptopirazinonas A-D, que exhibieron actividad contra *C. albicans* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (Chen *et al.*, 2018). Las caniferolidas A-D de *Streptomyces caniferus* CA-271066 de origen marino mostraron actividad antifúngica contra *C. albicans*, con valores de CMI que oscilaron entre 0,5 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$, que fueron comparativamente menores que la CMI de la anfotericina B (2–4 $\mu\text{g/mL}$) (Pérez-Victoria *et al.*, 2019). *Streptomyces xinghaiensis* SCSIO S15077 produce derivados de tunicamicina con actividad antifúngica contra aislados de *C. albicans* sensibles y resistentes a fluconazol, con énfasis en tunicamicina C3, que mostró valores de CIM de 4 y 2 $\mu\text{g/mL}$ (Zhang *et al.*, 2018).

Otros compuestos anti-*Candida* de *Streptomyces* spp. se han aislado de ambientes marinos, incluidas las nitricquinomicinas A – C (Zhou *et al.*, 2019); roqueicósido A (Aksoy *et al.*, 2015); 28-N-metilikaguramicina, isoikarugamicina e ikarugamicina (Lacret *et al.*, 2014); caboxamicina (Hohmann *et al.*, 2009) y piperazimicina B (Shaaban *et al.*, 2008). Otras actinobacterias diferentes de *Streptomyces*, fueron también reportadas; la fracción bioactiva de *Actinoalloateichus* sp. temostró tener amplio espectro de actividad anti-*Candida*. Cerulomicina A, un metabolito activo anti-*Candida* mostró CMI de 0,78 a 1,56 $\mu\text{g/ml}$ contra *C. albicans* resistente al fluconazol, de 0,39 a 0,78 $\mu\text{g/ml}$ contra *C.*

glabrata y de 0,78 a 1,56 µg/ml. Contra *C. krusei* (Ambavane *et al.*, 2014). Un actinomiceto derivado de sedimento ártico *Nocardia dassonvillei*, produjo sustancias extracelulares ricas en el metabolito N-(2-hidroxifenil)-2-fenazinamina mostrando actividad contra *C. albicans*, con un valor de CIM de 64 µg./ml (Kaneda *et al.*, 1988).

El presente estudio es un paso adelante en la investigación de compuestos bioactivos que derivan de actinomicetos marinos aislados del litoral central de la costa peruana. Para conocer el efecto bactericida real contra patógenos multidrogorresistentes y cepas patógenas de *Candida albicans* y otras especies de importancia clínica, se esperan realizar investigaciones posteriores de purificación de los compuestos activos, así como evaluaciones de la capacidad sinérgica de los componentes obtenidos con diferentes solventes. Además, futuros estudios de este tipo permitirán conocer la biodiversidad, biogeografía, distribución y el papel que cumplen los actinomicetos en los ecosistemas marinos; así como el potencial uso de sus productos en varios campos de la biotecnología microbiana.

6.4. Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de esponjas marinas

Desde hace algunas décadas, las esponjas han sido señaladas como fuentes muy importantes de principios activos de origen animal con potencial aplicación en tecnología farmacéutica. En el Perú, la información disponible sobre estos organismos es aún muy incipiente; de manera que, limita considerablemente tomar medidas correctas para su buen manejo, adecuado aprovechamiento y conservación (Córdor-Luján y Francia-Quiroz, 2022).

En el Perú, hasta la fecha se han descrito 46 especies de esponjas; a pesar de ello, se considera que esta cantidad está subestimada. Estudios realizados en otras latitudes señalan que la presencia de metabolitos secundarios con principios bioactivos antimicrobianos estaría presente en por lo menos 36 especies de esponjas pertenecientes a 11 de los 25 géneros registrados para el Perú (44 %), lo cual sugiere el alto potencial que tienen las esponjas peruanas como fuente de metabolitos antibacterianos (Córdor-Luján y Francia-Quiroz, 2022).

Las esponjas marinas como fuente notable de nuevos compuestos bioactivos naturales albergan una gran cantidad de microorganismos en sus tejidos que pueden representar aproximadamente 40 % de su biomasa y se cree ampliamente que una gran cantidad de productos de esponjas son producidos por microorganismos simbióticos (Ouyang & Chang, 2011). Las esponjas marinas han desarrollado interrelaciones específicas con

diversos miembros de microorganismos y estas relaciones tienen importancia ecológica y biológica (Selvan et al., 2012).

Investigaciones de los últimos años señalan la presencia de importantes géneros nuevos de actinobacterias (de los llamados “raros”) que colonizan a numerosos invertebrados, en especial a las esponjas marinas. *Verrucosispora andamanensis*, *Micromonospora spongicola*, *Saccharopolyspora spongiae*, *Marmoricola aquaticus*, *Nocardia xestospongiae*, *Rubrobacter aplysinae*, *Actinokineospora spheciospongiae*, *Williamsia spongiae* (Subramani & Sipkema, 2019)

Por otro lado, el mal uso y el uso excesivo de antibióticos en el tratamiento de patógenos han llevado a la aparición de microorganismos multirresistentes, lo que disminuye las posibilidades de tratar a las personas infectadas con los antibióticos existentes. Esta multirresistencia de patógenos exige la búsqueda de nuevos antimicrobianos naturales a partir de fuentes marinas, incluidas las esponjas; sin embargo, los conocimientos actuales señalan que los nuevos compuestos activos encontrados en las esponjas se originaron a partir de sus simbiosis microbianos (Anteneh et al., 2021).

Los casos de patógenos resistentes a antimicrobianos de uso común aumentan cada año, mientras que la necesidad de antibióticos como fármaco de elección para el tratamiento más importante es cada vez mayor. Uno de los esfuerzos para superar estos problemas de salud pública es la investigación científica orientada a la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos a partir de nuevas fuentes naturales, en especial en organismos marinos (Rante et al., 2022).

Un trabajo interesante realizado por Abdelmohsen et al. (2014) reporta el aislamiento e identificación de 47 actinomicetos asociados con esponjas marinas recolectadas en el arrecife Fsar (Arabia Saudita). Mediante secuenciación del gen rRNA 16S los aislados fueron asignados a 10 géneros de actinomicetos diferentes, 8 especies supuestamente nuevas pertenecientes a 4 géneros (*Kocuria*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*). Sorpresivamente no llegaron a aislar miembros del género *Streptomyces*. Los extractos orgánicos (acetato de etilo y metanólico) de nueve aislados mostraron actividad antimicrobiana contra al menos una de las bacterias de prueba (*Bacillus* sp. P25, *Escherichia coli* K12); además de hongos, parásitos y virus. Estos resultados enfatizan que las esponjas marinas son un recurso prolífico para nuevos actinomicetos bioactivos con potencial para el descubrimiento de fármacos.

Los estudios referentes a la presencia de actinomicetos en los invertebrados en general, pero en especial esponjas de mar se intensificaron las últimas tres décadas, con

resultados muy interesantes de nuevos metabolitos con actividad antimicrobiana, siendo *Streptomyces* el género dominante. En este sentido, a partir de *Streptomyces* sp. Ni-80 asociado a esponjas se aislaron los metabolitos urauchimicinas A y B que exhibieron actividad antifúngica contra *Candida albicans* a la CMI de 10 µg/mL (Imamura *et al.* 1993). Igualmente, se obtuvieron ocho nuevas estreptofenazinas (A – H) con actividades antibacterianas de amplio espectro (valores de CIM que oscilan entre 15,6 y 62,5 µg/mL) provenientes de *Streptomyces* sp. HB202 asociada a esponjas (Mitova *et al.* 2008). Otro metabolito, mayamicina exhibió actividad antibacteriana con valores de CMI entre 2,5 y 8,4 µg/mL también aislado de *Streptomyces* asociado a esponjas (Schneemann *et al.* 2010). La estreptofenazina K se aisló de *Streptomyces* HB202, que mostró actividad antibacteriana contra *B. subtilis* y *S. epidermidis* con valores de CMI de 21,6 y 14,5 µM, respectivamente (Kunz *et al.* 2014). *Streptomyces* sp. BCC45596 produjo urdamicinona E, urdamicinona G y dehidroxiaquayamicina, que fueron activos contra *M. tuberculosis* con valores de CMI de 3,13, 12,50 y 6,25 µg/mL, respectivamente (Supong *et al.* 2012). Cuatro nuevos compuestos (D1, D2, D3 y D4) de *Streptomyces* sp. LHW52447, mostraron actividad inhibitoria contra *S. aureus* (MRSA) con valores de CMI que oscilan entre 0,125 y 1,0 µg/mL (Jiao *et al.* 2018).

En los últimos años también fue posible el aislamiento de nuevas especies de *Streptomyces* aisladas de esponjas marinas. En este sentido, cabe señalar el aislamiento de *Streptomyces spongiicola* en China (Huang *et al.*, 2016), *Streptomyces atlanticus* aislada de la esponja *Aplysina fulva* en Brasil (Silva *et al.*, 2016), *Streptomyces tirandamycinicus* aislada de una esponja en China (Blockley *et al.*, 2017) y *Streptomyces zhaozhouensis* subsp. *mycale* aislada de la esponja *Mycale* sp. en la India (Dhaneesha *et al.*, 2019).

En nuestro estudio, se investigó la presencia de actinomicetos, específicamente del género *Streptomyces* asociados a dos géneros de esponjas de la clase Demospongiae: *Hymeniacidon* sp. y *Haliclona* sp. colectadas de la zona intermareal de dos puntos litorales de la costa peruana (localidades de Pucusana - Lima y San Juan de Marcona – Ica, respectivamente). A partir de estas fuentes fueron aislados un total de 37 cepas de actinomicetos; de los cuales 16 (43,2 %) presentaron al menos actividad inhibitoria de un patógeno MDR en prueba; 11 (29,7 %) aislados mostraron actividad antimicrobiana solamente a *Staphylococcus aureus* MR, cuatro (PUA, PU4-1, PU3-1, MAR6-5A) (10,8 %) lo hicieron a la vez frente a *Staphylococcus aureus* MR y *Enterococcus* sp. VanR. Igualmente, solo dos (MAR12-4A, MAR12-4B) (5,4 %) fueron activos solamente contra *Enterococcus* sp. VanR; sin embargo, solo otros dos de los actinomicetos (MAR16-4C y MAR16-4E) (5,4 %) presentaron actividad inhibitoria de

Staphylococcus aureus MR, *E. coli* BLEE+, *E. coli* AMPc y *Proteus mirabilis* BLEE+, excepto *Enterococcus* sp. VanR.

Las bacterias asociadas a las esponjas marinas han sido objeto de numerosos estudios para determinar su bioactividad. En este sentido, un aporte sumamente importante es el informe que presentan Asagabaldan et al. (2017); quienes, a partir de la esponja *Haliclona (Reniera)* sp. colectada de la costa de la isla Panjang, Jepara, Indonesia, lograron aislar bacterias asociadas a dicho organismo para luego determinar la actividad antimicrobiana contra otras bacterias, pero patógenas y resistentes a múltiples fármacos (MDR). Uno de los aislados, la cepa signada como PSP. 39-04 tuvo la mejor actividad contra los patógenos *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, y *Enterobacter cloacae*. Esta cepa promisoría, según la caracterización filogenética del gen RNAr 16S fue identificada como *Chromohalobacter salixigens*. El reporte toma relevancia debido que la esponja de origen de las bacterias bioactivas es el género *Haliclona* sp; es decir, el mismo género del cuál se lograron aislar los actinomicetos pertenecientes al género *Streptomyces*, esto es, a través de nuestro estudio realizado de las esponjas colectadas en San Juan de Marcona.

En los últimos años, para hacer frente a los patógenos multidrogorresistentes (MDR) emergentes y reemergentes se exploraron diversas especies de esponjas de ecosistemas marinos globalmente. Uno de estos trabajos interesantes corresponde a Antenedh et al., (2021); quienes exploraron ambientes marinos del Sur de Australia con el objetivo detectar metabolitos bioactivos de bacterias aisladas de las esponjas *Geodia* sp., *Chondrosida* sp., *Ircinia* sp., *Poecilosclerida* sp., *Crella* sp., *Sarcotragus* sp., *Carteriospongia foliascens*, *Aplysilla sulfurea*, *Dendrilla* sp. y *Tedania tubulifera*. Se cultivaron en 7 medios de cultivo y 4 condiciones de incubación, obteniendo un total de 1234 aislados bacterianos. De ellas, 169 se probaron en medios optimizados para producir metabolitos antimicrobianos, enfrentando contra 11 cepas de patógenos humanos. Se determinó que 70 aislados eran activas contra al menos un patógeno bacteriano o fúngico de prueba, en tanto, que el 37% mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus*, incluidas metilina resistentes y el 21% produjeron actividad antifúngica. Asimismo, se purificó un nuevo compuesto activo que inhibe a *S. aureus* MDR. Finalmente, la bacteria fue identificada mediante pruebas de RNAr 16S como *Streptomyces* sp. el estudio destaca a las esponjas marinas como una rica fuente de bacterias abundantes y diversas productoras de metabolitos con actividades antimicrobianas contra bacterias y hongos patógenos humanos. Nuestros resultados en comparación con lo señalado por Antenedh et al., (2021), difiere sustancialmente, debido que a que nuestro objetivo fue seleccionar actinomicetos con énfasis en

Streptomyces logrando aislar 37 cepas de los cuales 16 (43,2 %) presentaron al menos actividad inhibitoria de un uropatógeno MDR en prueba; 11 (29,7 %) aislados mostraron actividad antimicrobiana solamente a *Staphylococcus aureus* MR.

Estudios anteriores han informado de una cantidad razonable de actinomicetos aislados de esponjas marinas con diferentes números y formas morfológicas (Bibi *et al.*, 2018). El análisis genotípico también reveló que los aislados pertenecen preferencialmente al género *Streptomyces*; igualmente registrados en trabajos similares (Almeida *et al.*, 2019; Almanki, 2020; Rante *et al.*, 2022).

De acuerdo con nuestro informe, en el presente trabajo reportamos la presencia mayoritaria del género *Streptomyces*; sin embargo, algunos estudios también han informado de la presencia de otros géneros de actinobacterias. Este es el caso de reportes de alrededor de 20 géneros de actinobacterias, la mayoría pertenecientes a *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Kocuria*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Saccharopolyspora* y *Salinispora* que fueron aislados de varios géneros de esponjas marinas colectadas del sur de China, entre ellas *Haliclona*, *Phyllospongia*, *Amphimedon*, *Hippospongia*, *Agelas*, *Arenosclera*, *Cinachyrsina*, *Phakellia* y *Cliona* (Li *et al.*, 2015; Campana *et al.*, 2021).

Trabajos realizados en los últimos años presentaron reportes similares. Es el caso de Rante *et al.* (2022), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de actinomicetos, concretamente del género *Streptomyces* aislados de dos géneros de esponjas (*Haliclona* sp. y *Aplysina* sp.) procedentes de la isla Samalona, Sulawesi del Sur (Indonesia). Mediante pruebas *in vitro* realizadas en el medio SCA (Starch Casein Agar) y utilizando el método de vertido en placas, determinaron alta sensibilidad de los patógenos *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* resistentes a múltiples fármacos (MDR) frente a los actinomicetos seleccionados y designados como SML10h y SML10a. Tanto el procedimiento de prueba, cepas testigo, así como la fuente de aislamiento (esponja *Haliclona*) guardan cierta similitud con nuestros resultados. Complementa esta similitud el hecho que las cepas promisorias en nuestro caso fueron también aisladas de la esponja *Haliclona*, recolectada en San Juan de Marcona (Ica). La actividad inhibitoria fue demostrada por el efecto antimicrobiano del extracto de acetato de etilo a una concentración de 2 mg/20 µL contra los patógenos en prueba. Asimismo, el análisis filogenético de las secuencias del gen rRNA 16S reveló que la similitud de SML 10a estaba más estrechamente relacionada con *Streptomyces geysiriensis* (98%); mientras que, en nuestro caso la cepa promisorio MAR16-4E no fue vinculada a ninguna especie previamente registrada y por lo tanto fue designada como *Streptomyces* sp.

MAR16-4E. En este sentido, queda la posibilidad que, estudios posteriores determinen que esta cepa (MAR16-4E) represente una nueva especie.

En general, los invertebrados marinos, incluidas las esponjas son organismos menos explorados, pero se mantienen como una fuente promisoría de nuevos productos naturales e innovadores para la búsqueda urgente de nuevos compuestos bioactivos (Nair *et al.*, 2020).

VII. CONCLUSIONES

1. Los sedimentos marinos y las esponjas de la clase Demospongiae colectadas en la parte centro - sur de Perú y evaluadas en el presente trabajo son fuentes importantes sin explotar de actinomicetos y sus productos con potencial actividad antimicrobiana frente a patógenos multidrogosresistentes (MDR) de origen clínico.
2. Los actinomicetos bioactivos en particular pertenecen al género *Streptomyces*, cuyas cepas seleccionadas mostraron tener fuerte actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas multidrogosresistentes (MDR); así como actividad antifúngica contra *Candida albicans* de origen clínico.
3. Las esponjas (Demospongiae) recolectadas en la costa centro - sur de Perú son importantes fuentes de actinomicetos del género *Streptomyces* con actividad antimicrobiana particularmente frente a bacterias uropatógenas drogorresistentes de origen clínico.
4. Los actinomicetos asociados a sedimento marino ofrecen diversidad morfológica de las colonias, predominando la masa de esporas blancas (37,1 %), seguida de grises (29,04 %) y de otras pigmentaciones como blanca-rosáceas, cremas y blanca-amarillas. Asimismo, las observaciones microscópicas óptica y electrónica permitieron determinar el predominio de las estructuras miceliales y cadena de esporas en espiral; ratificando la presencia del género *Streptomyces*.
5. Los actinomicetos marinos evaluados en el presente trabajo son fuentes importantes de metabolitos bioactivos con actividad inhibitoria de patógenos clínicamente relevantes y resistentes a múltiples antibióticos de amplio espectro, características que favorecen como potenciales candidatos en el tratamiento de patógenos emergentes y reemergentes.
6. La determinación filogenética de especies de *Streptomyces* (*S. erythrogriseus*, *S. variabilis* y *S. rochei*) aisladas de sedimento marino, junto con las cepas de *Streptomyces* (*S. pulveraceus*, *S. aureoversilis* y *S. globisporus*) aisladas de Demospongiae, y otras cepas de *Streptomyces* no definidas a nivel de especies, permiten resaltar la trascendencia de esta investigación, siendo uno de los escasos trabajos reportados a la fecha en el Perú.

VIII. RECOMENDACIONES

1. En el presente estudio, solo se examinaron un número limitado de cepas de actinomicetos, que resultaron ser del género *Streptomyces* con actividades antimicrobianas. No se logró aislar otros géneros de actinobacterias debido principalmente a restricciones metodológicas; por ello, los proyectos a futuro deberán ampliar la cobertura del grupo llamado “actinomicetos raros” (no *Streptomyces*), de los cuales se tiene información de ser también productores de nuevos antimicrobianos.
2. Las actinobacterias marinas representan una fuente ilimitada de metabolitos de interés biomédico y biotecnológico. Esta potencialidad está condicionada por múltiples factores externos, que habrían dotado a las actinobacterias optar por vías metabólicas únicas y como consecuencia, capacidad de síntesis de nuevos compuestos bioactivos. Por ello, en estudios posteriores será una necesidad urgente de darle un enfoque multidisciplinario.
3. En comparación con el escenario global, el mar peruano está mínimamente explorado en el estudio de actinobacterias. Teniendo en cuenta la tasa decreciente de nuevos metabolitos de origen terrestre, su contraparte marina inexplorada, tendría un camino prometedor en la búsqueda de nuevos productos antimicrobianos.
4. Con el objetivo de maximizar la eficiencia en la obtención de metabolitos bioactivos a partir de extractos orgánicos se debe priorizar el estudio por fraccionamiento cromatográfico biodirigido bajo un enfoque multidisciplinario con participación de grupos de estudio del área de química o bioquímica.
5. Para dar impulso a una investigación moderna y actualizada se requiere mejorar sustancialmente los términos de estudio. En ese sentido, se requiere optimizar estrategias de estudio, métodos de aislamiento, uso de las herramientas y tecnologías actuales y el buen manejo de los datos genómicos obtenidos con la aplicación de la biología molecular.
6. La escasa bibliografía científica referida al estudio de actinobacterias del mar peruano permite señalar que existe un gran vacío en las exploraciones conducentes a la búsqueda de actinobacterias potencialmente bioactivas. En ese sentido, promover investigaciones prospectivas y mayor difusión de sus resultados.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, E. (2011). Plants: An alternative source for antimicrobials. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 1(6), 16–20.
- ABDELMOHSEN, U. R., YANG, C., HORN, H., HAJJAR, D., RAVASI, T., & HENTSCHEL, U. (2014). Actinomycetes from Red Sea Sponges: Sources for Chemical and Phylogenetic Diversity. *Marine Drugs*, 12(5), 2771-2789. <https://doi.org/10.3390/md12052771>
- ABDELMOHSEN, U. R.; BAYER, K.; HENTSCHEL, U. (2014). Diversity, abundance, and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Natural Product Reports*, 31, 381-399. doi: 10.1039/c3np70111e
- ABDELMOHSEN, U. R.; GRKOVIC T.; BALASUBRAMANIAN S.; KAMEL M, S.; QUINN R. J.; HENTSCHEL U. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnol. Adv.*, 33, 798–811. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.003>.
- ABDELMOHSEN, U. R.; PIMENTEL-ELARDO, S. M.; HANORA, A.; RADWAN, M.; ABOU-EL-ELA, S. H.; AHMED, S.; HENTSCHEL, U. (2010). Isolation, phylogenetic analysis, and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Marine drugs*, 8(3), 399–412. <https://doi.org/10.3390/md8030399>.
- ABDEL-RAZEK A. S.; EL-NAGGAR, M. E.; ALLAM, A.; MORSY, O. M.; OTHMAN, S. I. (2020). Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, 8, 470. <https://doi.org/10.3390/pr8040470>.
- AFONSO DE MENEZES, C. B.; AFONSO, R. S.; SOUZA, W. R.; PARMA, M.; MELO, I. S.; ZUCCHI, T. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. (2017). *Williamsia spongiae* sp. nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Amphimedon viridis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67, 1260–1265. DOI: 10.1099/ijsem.0.001796.
- AHMED R. N.; DANIEL, F.; GBALA, I. D.; SANNA, A. (2020). Potentials of actinomycetes from reserved environments as antibacterial agents against drug-resistant clinical bacterial strains. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 30(2), 251-258, <https://doi.org/10.4314/ejhs.v30i2.13>. PMID: 32165815; PMCID: PMC7060374.
- AHSAN, T.; CHEN, J.; ZHAO, X.; IRFAN, M.; WU, Y. (2017). Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. *AMB Express*, 7(1), 1-9. DOI 10.1186/s13568-017-0351-z. Epub 2017 Mar 3.
- AKHTER, N.; LIU, Y. Q.; AUCKLOO, B. N.; SHI, Y. T.; WANG, K. W.; CHEN, J. J.; WU, X. D.; WU, B. (2018). Stress-driven discovery of new angucycline-type antibiotics from a marine *Streptomyces pratensis* NA-ZhouS1. *Mar Drugs*, 16, 331. DOI: 10.3390/md16090331.
- AKSOY, S. C.; UZEL, A.; BEDIR, E. (2016). Cytosine-type nucleosides from marine-derived *Streptomyces rochei* 06CM016. *J Antibiot* (Tokyo), 69, 51–56. DOI:10.1038/ja.2015.72 [PubMed: 26126744].
- ALANÍS, A.J. (2005). Antibiotic resistance: are we in the post-antibiotic era? *Arco Med Res.*, 36, 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.arcomed.2005.06.009>.

- ALJELAWI, R. O.; KADHEM, M. F. (2016). Production, Purification, and Characterization of Bioactive Metabolites Produced from Rare Actinobacteria *Pseudonocardia alni*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 9, 264. [CrossRef]. DOI: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s3.14961>.
- ALMALKI MA. (2020). Isolation and characterization of polyketide drug molecule from *Streptomyces* species with antimicrobial activity against clinical pathogens. *J Infect Public Health* 13(1): 125-130. DOI: 10.1016/j.jiph.2019.07.002
- ALMEIDA EL, CARRILLO RINCÓN AF, JACKSON SA, AND DOBSON ADW. (2019). Comparative Genomics of Marine Sponge-Derived *Streptomyces* spp. Isolates SM17 and SM18 With Their Closest Terrestrial Relatives Provides Novel Insights Into Environmental Niche Adaptations and Secondary Metabolite Biosynthesis Potential. *Front. Microbiol.* 10:1713. doi: 10.3389/fmicb.2019.01713
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., & LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- AMBAVANE, V.; TOKDAR, P.; PARAB, R.; SREEKUMAR, E. S.; MAHAJAN, G.; MISHRA, P. D.; D'SOUZA, L.; RANADIVE, P. (2014). Caerulomycin A—An Antifungal Compound Isolated from Marine Actinomycetes. *Adv. Microbiol.*, 4, 567–578. DOI: [10.4236/aim.2014.49063](https://doi.org/10.4236/aim.2014.49063).
- ANTENEH, Y. S.; YANG, Q.; BROWN, M. H.; FRANCO, C. M. (2021). Antimicrobial Activities of Marine Sponge-Associated Bacteria. *Microorganisms*, 9(1), 171. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010171>.
- ANZAI, K.; NAKASHIMA, T.; KUWAHARA, N. (2008). Actinomycete bacteria isolated from the sediments at coastal and offshore area of Nagasaki Prefecture, Japan: Diversity and biological activity. *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 215–217. DOI: 10.1263/jbb.106.215.
- ARBAT, A. B.; ZODPE, S. N. (2014). Biodiversity of Actinomycetes species isolated from saline belt of Akola district. *Indian Journal of Applied Research*, 4(7), 450-452. DOI:10.36106/iJar.
- ARMBRUST, E. V.; PALUMBI, S. R. (2015) Marine biology. Uncovering hidden worlds of ocean biodiversity. *Science*, 22, 348(6237), 865-867. doi: 10.1126/science.aaa7378. PMID: 25999494.
- ARUL JOSE, P.; JHA, B. (2017). Intertidal marine sediment harbours Actinobacteria with promising bioactive and biosynthetic potential. *Sci. Rep.*, 7, 10041. [CrossRef]. DOI: [10.1038/s41598-017-09672-6](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09672-6).
- ASAGABALDAN M.A., AYUNINGRUM, D; KRISTIANA R; SABDONO A; RADJASA O.K.; TRIANTO A. (2017). Identification and Antibacterial Activity of Bacteria Isolated from Marine Sponge *Haliclona (Reniera)* sp. against Multi-Drug Resistant Human Pathogen. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 55 012019.
- ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M. I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL M. H.; NISAR, M. A.; ALVI, R. F.; ASLAM, M. A.; QAMAR, M. U.; SALAMAT, M. K. F.; BALOCH, Z. (2018). Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.*, 11, 1645–1658. Available online:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30349322> (accessed on 19 January 2019). [CrossRef] [PubMed].

ASNANI, A.; LUVIRIANI, E.; OEDJIJONO, O. (2020). Activity of actinomycetes isolated from mangrove Segara Anakan Cilacap toward Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 23, 1-7. <https://doi.org/10.14710/jksa.23.1.1-7>.

ATTA, H. (2007) Production of vitamin B 12 by *Streptomyces fulvissimus*. *Egyptian Journal of Biomedical Sciences*, 23(1), 166-184. DOI:[10.4314/ejbs2.v23i1.40302](https://doi.org/10.4314/ejbs2.v23i1.40302).

ATTIMARAD, S. L.; EDIGA, G. N.; KARIGAR, A. A.; KARADI, R.; CHANDRASHEKHAR, S.; CHANDRASHEKHAR, N. (2012). Screening, isolation and purification of antibacterial agents from marine actinomycetes. *Int. Curr. Pharm. J.*, 1, 394–402. DOI:[10.3329/icpj.v1i12.12448](https://doi.org/10.3329/icpj.v1i12.12448).

AUGUSTINE, D.; JACOB, J. C.; RAMYA, K. D.; PHILIP, R. (2013). Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: Biochemical and physiological characterization. *Int. J. Res. Mar. Sciences*, 2(2), 56-63. <https://www.semanticscholar.org/paper1895ab1c11f491c463200168497149>.

AYARI, A.; MORAKCHI, H.; KIRANE-GACEMI, D. (2016). Evaluation of antifungal activity of novel marine actinomycete, *Streptomyces* sp. AA13 isolated from sediments of Lake Oubeira (Algeria) against *Candida albicans*. *African Journal of Microbiology Research*, 10(6), 156-171. DOI:[10.5897/AJMR2013.7765](https://doi.org/10.5897/AJMR2013.7765).

AZMAN, A. S.; OTHMAN, I.; VELU, S. S.; CHAN, K. G.; LEE, L. H. (2015). Mangrove rare actinobacteria: Taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Front. Microbiol.*, 6, 856. [CrossRef]. DOI:[10.5897/AJMR2013.7765](https://doi.org/10.5897/AJMR2013.7765).

BAE, M.; CHUNG, B.; OH, K. B.; SHIN, J.; OH, D. C. (2015b). Hormaomycins B and C: new antibiotic cyclic depsipeptides from a marine mudflat-derived *Streptomyces* sp. *Mar Drugs*, 13, 5187–5200. DOI:10.3390/md13085187 [PubMed: 26287218]. <https://www.researchgate.net/publication/294261065>.

BAE, M.; KIM, H.; MOON, K.; NAM, S. J.; SHIN, J.; OH, KB.; OH, D. C. (2015a). Mohangamides A and B, new dilactone-tethered pseudo-dimeric peptides inhibiting *Candida albicans* isocitrate lyase. *Org Lett.*, 17, 712–715. DOI:10.1021/ol5037248 [PubMed: 25622093].

BAHRAMI, Y.; DELBARI, Y.; BUZHANI, K. R.; KAKAEI, E.; MOHASSEL, Y.; BOUK, S.; FRANCO, C. M. M. (2022). Natural Products from Actinomycetes: Diversity, Ecology and Drug Discovery (eds Ravishankar V. Rai & Jamuna A. Bai), 119–150. (Springer Singapore). <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-16-6132-7>.

BAI, J. L.; WANG, Y.; QIN, S.; DING, P.; XING, K.; YUAN, B.; CAO, C. L.; HUANG, Y.; ZHANG, Y. Q.; JIANG, J. H. (2016). *Nocardia jiangsuensis* sp. nov., an actinomycete isolated from coastal soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 4633–4638. [CrossRef]. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001402>.

BALASUBRAMANIAN, S.; SKAF, J.; HOLZGRABE, U.; BHARTI, R.; FÖRSTNER, K.; ZIEBUHR, W.; HUMEIDA, U.; ABDELMOHSEN, U.; OELSCHLAEGER, T. (2018). A new bioactive compound from the Marine sponge-derived *Streptomyces* sp. SBT348 inhibits

Staphylococcal growth and biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1473-91. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01473. eCollection 2018.

BALLAV, S.; KERKAR, S.; THOMAS, S. K.; AUGUSTINE, N. (2015). Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(3), 323-330. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.08.017. Epub 2014 Oct 22.

BALTZ, R. H. (2017). Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 44, 573–588. DOI: 10.1007/s10295-016- 1815-x.

BAO, Y.; LI, H.; DONG, Y.; DUAN, H.; LI, H.; LI, W. (2022). Genome-Guided Discovery of Antifungal Filipins from a Deep-Sea-Derived *Streptomyces antibioticus*. *J. Nat. Prod.*, 85, 365–374. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00952>.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZEL, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80, 1–43. DOI:10.1128/MMBR.00019-15.

BASKARAN, R.; VIJAYAKUMAR, R.; MOHAN, P. (2011). Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands India. *Malays. J. Microbiol.* 7, 26–32. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00952>.

BATTERSHILL, C.; JASPARS, M.; LONG, P. (2005). Marine biodiversity: new drugs from the ocean depths. *Biologist*, 52, 107–114. <https://www.google.com/url?sa>.

BATTISTUZZI, F.; HEDGES, S. (2009). A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. Multiple Evidence Supporting Two Major Groups of Eubacteria. *Mol Biol Evol*, 26(2), 335-343. DOI: 10.1093/molbev/msn247.

BEHAL, V. (2000). Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol*, 47, 113–157. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(00\)47003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(00)47003-6).

BERDY, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58, 1-26. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>.

BERDY, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J. Antibiot.*, 65, 385–395. [CrossRef]. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>.

BHAWSAR, S. (2012). Scuba Diving for Marine Microbiologists. Available online: <https://www.biotecharticles.com/CareersAr>.

BIBI, F.; ALVI, S.A.; AL-SOFYANI, A.; YASIR, M.; KENSARAH, E.A.; AZHAR, E.I. (2018). Research Article Two marine sponges-associated cultivable bacteria: Diversity and biological activities. *Genet. Mol. Res.* 17, 16039910. [Google Scholar] [CrossRef].

BIBI, F.; FAHEEM, M.; AZHAR, E. I.; YASIR, M.; ALVI, S. A.; KAMAL, M. A.; ULLAH, I.; NASEER, M. I. (2017). Bacteria from marine sponges: A source of new drugs. *Curr. Drug Metab.*, 18, 11–15. DOI: 10.2174/1389200217666161013090610.

BIBI, F.; YASIR, M.; AL-SOFYANI, A.; NASEER, M. I.; AZHAR, E. I. (2020). Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi J. Biol. Sci.*, 27, 1139–1147. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.02.002.

- BISSO-ANDRADE, A. (2018). Resistencia a antimicrobianos. *Rev Soc Peru Med Interna.*, 31(2), 50-59. DOI: <https://doi.org/10.36393/spmi.v31i2.32>.
- BISWAS, K.; CHOUDHURY, J. D.; MAHANSARIA, R.; SAHA, M.; MUKHERJEE, J. (2017). *Streptomyces euryhalinus* sp. nov., a new actinomycete isolated from a mangrove forest. *J. Antibiot.*, 70, 747–753. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2017.3>.
- BLOCKLEY, A.; ELLIOTT, D.; ROBERTS, A.; SWEET, M. (2017). Symbiotic Microbes from Marine Invertebrates: Driving a New Era of Natural Product Drug Discovery. *Diversity*, 9, 49. <https://doi.org/10.3390/d9040049>.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, V. P.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. (2007). Marine natural products. *Nat Prod Rep.*, 24, 31–86. DOI: [10.1039/B603047P](https://doi.org/10.1039/B603047P).
- BREDHOLDT, H.; GALATENKO, O.; ENGELHARDT, K.; FJAERVIK, E.; TEREKHOVA, L. P.; ZOTCHEV, S. B. (2007). Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity, and biological activity. *Environ. Microbiol.*, 9, 2756–2764. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2007.01387.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01387.x).
- BREDHOLT, H.; FJAERVIK, E.; JOHNSEN, G.; ZOTCHEV, S. B. (2008). Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Marine Drugs*, 6, 12-24. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2007.01387.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01387.x).
- BULL, A. T.; STACH, J. E. (2007). Marine actinobacteria: New opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.*, 15(11), 491–499. DOI: 10.1016/j.tim.2007.10.004.
- BULL, A. T.; STACH, J. E. M.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. (2005). Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 65–79. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6562-8>.
- BULL, A.T.; ALAN, C. W.; MICHAEL, G. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 573–606. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6562-8>.
- BUTLER, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141-2153. <https://doi.org/10.1021/np040106y>.
- CAMPANA, S.; BUSCH, K.; HENTSCHEL, U.; MUYZER, G.; DE GOEIJ, J. M. (2021). DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) identifies marine sponge-associated bacteria actively utilizing dissolved organic matter (DOM). *Environmental Microbiology.*, 23(8), 4489-4504. DOI: 10.1111/1462-2920.15642.
- CAO, D. T.; NGUYEN, T. L.; TRAN, V. H.; DOAN-THI-MAI, H.; VU-THI, Q.; NGUYEN, M. A.; LE-THI, H.; CHAU, V. M.; PHAM, V. C. (2019). Synthesis, structure, and antimicrobial activity of novel metabolites from a marine actinomycete in Vietnam's East Sea. *Nat Prod Commun*, 14, 121–124. DOI:10.1177/2F1934578X1901400132.
- CASTILLO, U.; MYERA, S.; BROWN, L.; STROBEL, G.; HESS, W. M.; HANKS, J.; REAY, D. (2005). Scanning electron microscopy of some endophytic *Streptomyces* in snakevine *Kennedia nigricans*. *Scanning*, 27, 305–311.

- CHACKO, S.; SHARMA, V.; AVID, E. (2012). A comparative study on selected marine actinomycetes from Pulicat, Muttukadu, and Ennore estuaries. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2, S1827–S1834. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60503-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60503-6).
- CHALLINOR, V. L.; BODE, H. B. (2015). Bioactive natural products from novel microbial sources. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1354, 82–97. [CrossRef] [PubMed]. DOI: 10.1111/nyas.12954.
- CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100, 14555–14561. [CrossRef] [PubMed]. DOI: 10.1073/pnas.1934677100. Epub 2003 Sep 11.
- CHANDRA, G.; CHATER, K. F. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiol Rev.*, 38(3), 345–79. doi: 10.1111/1574-6976.12047. Epub Nov 19. PMID: 24164321; PMCID: PMC4255298. DOI: [10.1111/1574-6976.12047](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12047).
- CHEN, C.; YE, Y.; WANG, R.; ZHANG, Y.; WU, C.; DEBNATH, S. C.; MA, Z.; WANG, J.; WU, M. (2018). *Streptomyces nigra* sp. nov. Is a Novel Actinobacterium Isolated From Mangrove Soil and Exerts a Potent Antitumor Activity In Vitro. *Front. Microbiol.*, 9, 1587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01587>,
- CHEN, H.; CAI, K.; YAO, R. (2018). A new macrolactam derivative from the marine actinomycete HF-11225. *J Antibiot*, 71, 477–479. DOI:10.1038/s41429-017-0021-z.
- CHEN, J.; XU, L.; ZHOU, Y.; HAN, B. (2021). Natural Products from Actinomycetes Associated with Marine Organisms. *Mar. Drugs*, 19, 629. <https://doi.org/10.3390/md19110629>.
- CHEN, M.; CHAI, W.; ZHU, R.; SONG, T.; ZHANG, Z.; LIAN, X.-Y. (2018). Streptopyrazinones A–D, rare metabolites from marine-derived *Streptomyces* sp. ZZ446. *Tetrahedron*, 74, 2100–2106. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.03.028>.
- CHEN, P.; ZHANG, L.; WANG, J.; RUAN, J.; HAN, X.; HUANG, Y. (2016). *Brevibacterium sediminis* sp. nov., isolated from deep-sea sediments from the Carlsberg and southwest Indian ridges. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 5268–5274. [PubMed]. DOI: [10.1111/1574-6976.12047](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12047).
- CHEN, S.; ZHANG, D.; CHEN, M.; ZHANG, Z.; LIAN, X. Y. (2018). A rare diketopiperazine glycoside from marine sourced *Streptomyces* sp. ZZ446. *Nat Prod Res*, 1–5. DOI:10.1080/14786419.
- CITA, Y. P.; SUHERMANTO, A.; RADJASA, O. K.; SUDHARMONO, P. (2017). Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge *Xestospongia testudinaria* from Sorong, Papua. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 7, 450–454. DOI: 10.1016/j.apjtb.2017.01.024.
- CLAVERIAS, F. P.; UNDA BARRENA, A.; GONZALEZ, M.; SEEGER, M.; CAMARA, B. (2015). Culturable diversity and antimicrobial activity of Actinobacteria from marine sediments in Valparaiso Bay, Chile. *Frontiers in Microbiology*, 6, 737. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00737. eCollection 2015.

- CÓNDOR-LUJÁN, B. Y FRANCIA-QUIROZ, J. C. (Eds.). (2022). Manual de procedimientos para la bioprospección de esponjas marinas del Perú. Fondo Editorial de la Universidad Científica del Sur. <https://doi.org/10.21142/li.2022.2729>
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. (2013). Natural products: a continuous source of new drugs. *Biochim Biophys Acta.*, 1830, 3670–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>.
- CROSS, T.; GOODFELLOW, M. (1973). Taxonomy and classification of the actinomycetes. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 2, 11–112. PMID: 4584092.
- DANIEL, W. U.; ERIN, A. G.; ADAM, C. J.; CARLA, S. J.; ANDREW, J.; JONES, W. S.; JACLYN, M. W. (2011). Significant natural product biosynthetic potential of actinorhizal symbionts of the genus *Frankia*, as revealed by comparative genomic and proteomic analyses. *Appl Environ Microbiol*, 11, 3617–3625. <https://doi.org/10.1128/AEM.00038-11>.
- DAS, M.; ROYER, T. V.; LEFF, L. G. (2007). Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 756-767. DOI: 10.1128/AEM.01170-06. Epub 2006 Dec.
- DAS, S.; LYLA, P. S.; AJMAL, K. S. (2008). Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese J. Oceanol. Limnol.*, 26, 166–177. <https://doi.org/10.1007/s00343-008-0166-5>.
- DASTAGER, S. G.; MAWLANKAR, R.; TANG, S. K.; KRISHNAMURTHI, S.; RAMANA, V. V.; JOSEPH, N.; SHOUCHE, Y. S. (2014a). *Rhodococcus enclensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rhodococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2693–2699. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijs.0.061390-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.061390-0).
- DASTAGER, S. G.; TANG, S. K.; SRINIVASAN, K.; LEE, J. C.; LI, W. J. (2014b). *Kocuria indica* sp. nov., isolated from a sediment sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 869–874. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijs.0.052548-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.052548-0).
- DASTAGER, S.; DAYANAND, L. W. J. A.; TANG, S. K.; TIAN, X. P.; ZHI, X. Y.; XU, L. H.; JIANG, C. (2006). Separation, identification, and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *Afr J Biotechnol*, 5, 1131–1134. <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- DE LA HOZ-ROMO, M. C.; DÍAZ, L.; VILLAMIL, L. (2022). Marine Actinobacteria a New Source of Antibacterial Metabolites to Treat Acne Vulgaris Disease—A Systematic Literature Review. *Antibiotics*, 11, 965. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070965>.
- DE MENEZES, C. B.; TONIN, M. F.; SILVA, L. J.; DE SOUZA, W. R.; PARMA, M.; DE MELO, I. S.; ZUCCHI, T. D.; DESTÉFANO, S. A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. (2015). *Marmoricola aquaticus* sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sponge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 2286–2291. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.000254](https://doi.org/10.1099/ijs.0.000254)
- DENG, S.; CHANG, X.; ZHANG, Y.; REN, L.; JIANG, F.; QU, Z.; PENG, F. (2015). *Nocardioides antarcticus* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 2615–2621. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.000309](https://doi.org/10.1099/ijs.0.000309).

- DHAKAL, D.; POKHREL, A. R.; SHRESTHA, B.; MAHARJAN, J.; SOHNG, J. K. (2020). *Streptomyces* species: A promising source of antifungal metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104, 2253–2264.
- DHAKAL, D.; POKHREL, A. R.; SHRESTHA, B.; SOHNG, J. K. (2017). Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Front. Microbiol.*, 8, 1106. [CrossRef]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01106>.
- DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. (2008). An antifungal compound: 4'phenyl-1-naphthylphenyl acetamide from *Streptomyces* sp. DPTTB16. *Facts Universitatis (Medicine and Biology)*, 15, 7-12. <https://www.researchgate.net/publication/242160067>.
- DHANEESHA, M.; HASIN, O.; SIVAKUMAR, K. C.; RAVINESH, R.; NAMAN, C. B.; CARMELI, S.; SAJEEVAN, T. P. (2019). DNA Binding and Molecular Dynamic Studies of Polycyclic Tetramate Macrolactams (PTM) with Potential Anticancer Activity Isolated from a Sponge Associated *Streptomyces zhaozhouensis* subsp. mycale subsp. nov. *Mar. Biotechnol.*, 21, 124-137. DOI: [10.1007/s10126-018-9866-9](https://doi.org/10.1007/s10126-018-9866-9).
- DHARMARAJ, S. (2010a). Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2123-2139. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0415-6>.
- DHARMARAJ, S.; ASHOKKUMAR, B.; DHEVENDARAN, K. (2010b). Isolation of marine *Streptomyces* and the evaluation of its bioactive molecules. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 240–248. <http://www.academicjournals.org/ajmr>.
- DHOLAKIYA, R. N.; KUMAR, R.; MISHRA, A.; MODY, K. H.; JHA, B. (2017). Antibacterial and Antioxidant Activities of Novel Actinobacteria Strain Isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. *Front. Microbiol.*, 8, 2420. [CrossRef]. DOI: [10.3389/fmicb.2017.02420](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02420).
- DIETZ, A.; MATHEWS, J. (1971). Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl Microbiol*, 21, 527–533. DOI: [10.1128/am.21.3.527-533.1971](https://doi.org/10.1128/am.21.3.527-533.1971).
- DONALD, L.; PIPITE, A.; SUBRAMANI, R.; OWEN, J.; KEYZERS, R. A.; TAUFA, T. (2022). *Streptomyces*: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, A Current Perspective. *Microbiol. Res.*, 13, 418–465. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>.
- DU, Z. J.; MIAO, T. T.; LIN, X. Z.; LIU, Q. Q.; CHEN, G. J. (2013). *Flaviflexus huanghaiensis* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium of the family Actinomycetaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 1863–1867. [CrossRef] [PubMed]. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>.
- DUNCAN, K. R.; HALTLI, B.; GILL, K. A.; CORREA, H.; BERRUE, F.; KERR, R. G. (2015). Exploring the diversity and metabolic potential of actinomycetes from temperate marine sediments from Newfoundland, Canada. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42, 57-72. DOI: [10.1007/s10295-014-1529-x](https://doi.org/10.1007/s10295-014-1529-x).
- DUNCAN, K. R.; HALTLI, B.; GILL, K. A.; KERR, R. G. (2014). Bioprospecting from Marine Sediments of New Brunswick, Canada: Exploring the Relationship between Total

Bacterial Diversity and Actinobacteria Diversity. *Marine Drugs*, 12, 899-925. DOI: [10.3390/md12020899](https://doi.org/10.3390/md12020899).

DURAI PANDIYAN, V.; SASI, A. H.; ISLAM, V. I. H.; VALANARASU, M.; IGNACIMUTHU, S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Médicale. India.*, 20, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2009.11.002>.

EDWARDS, C. (1993). Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Appl Biochem Biotechnol*, 42, 161–179. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02788050>.

ELIAS, F.; MUDDADA, S.; MULETA, D.; TEFERA, B. (2022). Antimicrobial potential of *Streptomyces* spp. isolated from the Rift Valley regions of Ethiopia. *Advances in Pharmacological Pharmaceutical Sciences*, 13. <https://doi.org/10.1155/2022/1724906>.

EL-TARABILY, K. A.; NASSAR, A. H.; SIVASITHAMPARAM, K. (2020). Microbial Metabolites in Sustainable Agroecosystem. Springer; Singapore: Soil Actinomycetes and Their Metabolites for Control of Plant Fungal Pathogens, 279–310.

EUZÉBY, J.P. (1997). List of bacterial names withstanding in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 590–592. [Crossref. PubMed](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10.1099/00207713-47-2-590/). DOI: 10.1099/00207713-47-2-590.

FAN, X.; QIAO, Y.; GAO, X.; ZHANG, X. H. (2014a). *Nocardioides pacificus* sp. nov., isolated from deep sub-seafloor sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2217–2222. [CrossRef] [PubMed].

FAN, X.; ZHANG, Z.; LI, Z.; ZHANG, X. H. (2014b). *Luteococcus sediminum* sp. nov., isolated from deep subseafloor sediment of the South Pacific Gyre. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2522–2527. [CrossRef]. DOI: 10.1099/ijs.0.059873-0. Epub 2014 Apr 3.

FAUCHER, E.; SAVARD, T.; BEALIEU, C. (1992). Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can J Plant Pathol*. 14, 197–202. <http://dx.doi.org/10.1080/07060669209500874>.

FEHLING, R. H.; BUCHANAN, G.O.; MINCER, T.J.; KAUFFMAN, C.A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. (2003). Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew Chem Int Ed*, 42, 355–357. DOI:10.1002/anie.200390115.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. (2006). Developing a new resource for drug discovery: Marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol*, 2, 666–673. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio841>.

FLÄRDH, K.; BUTTNER, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol*, 7, 36 –49. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1968>.

FLEMER, B.; KENNEDY, J.; MARGASSERY, L. M.; MORRISSEY, J. P.; O’GARA, F.; DOBSON, A. D. (2011). Diversity and antimicrobial activities of microbes from two Irish marine sponges, *Suberites carnosus* and *Leucosolenia* sp. *J. Appl. Microbiol.*, 112, 289–301. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05211.x.

- FOXLEE, N. D.; TOWNELL, N.; MCIVER, L.; LAU, C. L. (2019). Antibiotic Resistance in Pacific Island Countries and Territories: A Systematic Scoping Review. *Antibiotics*, 8, 29. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.3390/antibiotics8010029](https://doi.org/10.3390/antibiotics8010029).
- FRANCO-CORREA, M. (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología.*, 16 (2), 239-242. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195014939019>.
- GANESHKUMAR, A.; GONÇALE, J. C.; RAJARAM, R.; JUNQUEIRA, J. C. (2023). Anti-Candidal Marine Natural Products: A Review. *J. Fungi*, 9, 800. <https://doi.org/10.3390/jof9080800>.
- GEBREYOHANNES, G.; MOGES, F.; SAHILE, S.; RAJA, N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), 426-435. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60092-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60092-1).
- GIRARD, G.; TRAAG, B. A.; SANGAL, V.; MASCINI, N.; HOSKISSON, P.A.; GOODFELLOW, M.; VAN WEZEL, G. P. (2013). A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open Biol*, 3, 130073. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.130073>.
- GIRARD, G.; WILLEMSE, J.; ZHU, H.; CLAESSEN, D.; BUKARASAM, K.; GOODFELLOW, M.; VAN WEZEL, G. P. (2014). Analysis of novel kitasatosporae reveals significant evolutionary changes in conserved developmental genes between *Kitasatospora* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 365–380. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-014-0209-1>.
- GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. (2007). Phylogenetic diversity of grampositive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3272-3282. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02811-0>.
- GONZÁLEZ MENDOZA, J.; MAGUIÑA VARGAS, C.; GONZÁLEZ PONCE, F. M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Med Peru.*, 36(2), 145-51. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172019000200011&lng=es&tlng=es.
- GONZALEZ-FRANCO, A. C.; ROBLES HERNANDE, Z.; NUÑEZ BARRIOS, A.; STRAP, J. L.; CRAWFORD, D. L. (2009). Molecular and cultural analysis of seasonal Actinomycetes in soils from *Artemisia tridentata* habitat. *Inter J Experim Botany*, 78, 83–90. <https://doi.org/10.32604/phyton.2009.78.083>.
- GOODFELLOW, M. WILLIAMS, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol.* 37, 189 –216. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>.
- GOODFELLOW, M.; HAYNES, J. A. (1984). Actinomycetes in marine sediments. Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes. *Orlando: Academic press*, 453–72. eBook ISBN: 9781483273693.
- GOODFELLOW, M.; NOUIOUI, I.; SANDERSON, R.; XIE, F.; BULL, A. T. (2018). Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abound in Atacama Desert soils. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 1315–1332. DOI: 10.1007/s10482-018-1088-7.

GOZARI, M.; ZAHERI, A.; TAMADONI, S.; JAHROMI, S. T.; GOZARI, M.; KARIMZADEH, R. (2019). Screening and characterization of marine actinomycetes from northern Oman Sea sediments for their cytotoxic and antimicrobial activity. *Int Microbiol*, 22, 521–530. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00083-3> - DOI - PubMed.

GRAÇA, A. P.; BONDOSO, J.; GASPAR, H.; XAVIER, J. R.; MONTEIRO, M. C.; DE LA CRUZ, M.; OVES-COSTALES, D.; VICENTE, F.; LAGE, O. M. (2013). Antimicrobial Activity of Heterotrophic Bacterial Communities from the Marine Sponge *Erylus discophorus* (Astrophorida, Geodiidae) *PLoS ONE*, 8, e78992. DOI: 10.1371/journal.pone.0078992.

GRACA, A. P.; VIANA, F.; BONDOSO, J.; CORREIA, M. I.; GOMES, L.; HUMANES, M.; REIS, A.; XAVIER, J. R.; GASPAR, H.; LAGE, O. M. (2015). The antimicrobial activity of heterotrophic bacteria isolated from the marine sponge *Erylus deficiens* (Astrophorida, Geodiidae) *Front. Microbiol.*, 6, 389. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00389.

GUERRERO-GARZÓN, J.F.; ZEHL, M.; SCHNEIDER, O.; RÜCKERT, C.; BUSCHE, T.; KALINOWSKI, J.; BREDHOLT, H.; ZOTCHEV, S. B. (2020). *Streptomyces* spp. From the Marine Sponge *Antho dichotoma*: Analyses of Secondary Metabolite Biosynthesis Gene Clusters and Some of Their Products. *Front. Microbiol*, 11, 437. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00437.

GUNASEKARAN, M.; THANGAVEL, S. (2013). Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobial. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 2(3),115-126.

HAMADA, M.; SHIBATA, C.; TAMURA, T.; SUZUKI, K. (2013a). *Zhihengliuella flava* sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sediment, and emended description of the genus *Zhihengliuella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 4760–4764. [CrossRef]. DOI: 10.1099/ijs.0.053272-0.

HAMADA, M.; SHIBATA, C.; TAMURA, T.; SUZUKI, K. (2014). *Agromyces marinus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from sea sediment. *J. Antibiot.*, 67, 703–706. [CrossRef]. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2014.60>.

HAMADA, M.; SHIBATA, C.; TAMURA, T.; YAMAMURA, H.; HAYAKAWA, M.; SUZUKI, K. (2013b). *Janibacter cremeus* sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 3687–3690. [CrossRef] [PubMed]. DOI 10.1099/ijs.0.051532-0.

HAMADA, M.; TAMURA, T.; SHIBATA, C.; YAMAMURA, H.; HAYAKAWA, M.; SCHUMANN, P.; SUZUKI, K. (2013c). *Paraoerskovia sedimicola* sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sediment, and emended description of the genus *Paraoerskovia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 2637–2641. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.043745-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.043745-0).

HAMED, A.; ABDEL-RAZEK, A. S.; FRESE, M.; WIBBERG, D.; ELHADDAD, A. F.; IBRAHIM, T. M.; KALINOWSKI, J.; SEWALD, N.; SHAABAN, M. (2018). N-Acetylborrelidin B: a new bioactive metabolite from *Streptomyces mutabilis* sp. MII. *Z Naturforsch C*, 73, 49–57. DOI:10.1515/znc-2017-0140 [PubMed: 29055178].

HAMED, M. M.; ABDELFATTAH, L. S.; FAHMY, M. M. (2019). Antimicrobial Activity of Marine Actinomycetes and the Optimization of Culture Conditions for the Production of

Antimicrobial Agent(s), *J Pure Appl Microbiol.*, 13(4), 2177-2188.
<https://doi.org/10.22207/JPAM.13.4.30>.

HAMES-KOCABAS, E. E.; UZEL, A. (2012). Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 88, 342-347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.010>.

HARUNARI, E.; HAMADA, M.; SHIBATA, C.; TAMURA, T.; KOMAKI, H.; IMADA, C.; IGARASHI, Y. (2016). *Streptomyces hyaluromycini* sp. nov., isolated from a tunicate (*Molgula manhattensis*). *J. Antibiot.*, 69, 159–163. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2015.110>.

HASSAN, S. S. U.; SHAIKH, A. L. (2017). Marine actinobacteria as a drug treasure house. *Biomed. Pharmacother.* 87, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.086>.

HENTSCHHEL, U.; PIEL, J.; DEGNAN, S. M.; TAYLOR, M. W. (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 641-654. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2839>.

HENTSCHHEL, 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. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00816.x.

HIFNAWY, M.; HASSAN, H. M.; MOHAMMED, R.; FOUUDA, M.; SAYED, A. M.; HAMED, A.; ABOUZID, S. F.; RATEB, M. E.; ALHADRAMI, H.; ABDELMOHSEN, U. R. (2020). Induction of Antibacterial Metabolites by Co-Cultivation of Two Red-Sea-Sponge-Associated Actinomycetes *Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinespora* sp. EG49. *Marine Drugs*, 18(5), 243. DOI: [10.3390/md18050243](https://doi.org/10.3390/md18050243).

HIGGINBOTHAM, S.J.; MURPHY, C.D. (2010). Identification and characterization of a *Streptomyces* sp. isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*; 165, 82–6. DOI: [10.1016/j.micres.2008.12.004](https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.12.004).

HOHMANN, C.; SCHNEIDER, K.; BRUNTNER, C.; IRRAN, E.; NICHOLSON, G.; BULL, A. T.; JONES, A. L.; BROWN, R.; STACH, J. E. M.; GOODFELLOW, M.; BEIL, W.; KRÄMER, M.; IMHOFF, J. F.; SÜSSMUTH, R. D.; FIEDLER, H. P. (2009). Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *J. Antibiot.*, 62, 99–104. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2008.24>.

HOPWOOD, D.; BUTTNER, M.; BIBB, M.; KIESER, T.; CHARTER, K. (2000). Antibiotic production by *Streptomyces*. *Pract. Streptomyces Genet.* 1, 1–42.

HOSHINO, T.; DOI, H.; URAMOTO, G. I.; WORMER, L.; ADHIKARI, R. R.; XIAO, N.; MORONO, Y.; D'HONDT, S.; HINRICHS, K. U.; INAGAKI, F. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 117, 27587–27597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919139117>.

HOSODA, K.; KOYAMA, N.; KANAMOTO, A.; TOMODA, H. (2019). Discovery of *nosiheptide*, *griseoviridin*, and etamycin as potent anti-mycobacterial agents against *Mycobacterium avium* complex. *Molecules*, 24, 1495. DOI:10.3390/molecules24081495.

<https://doi.org/10.1002/sca.4950270606>.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2006.00110.x>.

- HU, Y.; CHEN, J.; HU, G.; YU, J.; ZHU, X.; LIN, Y.; CHEN, S.; YUAN, J. (2015). Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Mar. Drugs*, 13, 202–221. DOI: 10.3390/md13010202.
- HU, Y.; WANG, M.; WU, C.; TAN, Y.; LI, J.; HAO, X.; DUAN, Y.; GUAN, Y.; SHANG, X.; WANG, Y.; XIAO, C.; GAN, M. (2018). Identification and proposed relative and absolute configurations of niphimycins C–E from the marine-derived *Streptomyces* sp. IMB7–145 by genomic analysis. *J Nat Prod*, 81,178–187. DOI:10.1021/acs.jnatprod.7b00859 [PubMed: 29308897].
- HUANG, H.; LIU, M.; ZHONG, W.; MO, K.; ZHU, J.; ZOU, X.; HU, Y.; BAO, S. (2018). *Streptomyces caeni* sp. nov., isolated from mangrove mud. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 68, 3080–3083. DOI 10.1099/ijsem.0.002916.
- HUANG, X.; ZHOU, S.; HUANG, D.; CHEN, J.; ZHU, W. (2016). *Streptomyces spongiicola* sp. nov., an actinomycete derived from marine sponge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 738–743. DOI: [10.1099/ijsem.0.000782](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000782).
- HUGHES, C. C.; PRIETO-DAVO, A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. (2008). The Marinopyrroles, Antibiotics of an Unprecedented Structure Class from a Marine *Streptomyces* sp. *Organic Letters*, 10, 629–631. <https://doi.org/10.1021/ol702952n>.
- IAN, E.; MALKO, D. B.; SEKUROVA, O. N.; BREDHOLT, H.; RUCKERT, C.; BORISOVA, M. E.; ALBERSMEIER, A.; KALINOWSKI, J.; GELFAND, M. S.; ZOTCHEV, S. B. (2014). Genomics of sponge-associated *Streptomyces* spp. closely related to *Streptomyces albus* J1074: insights into marine adaptation and secondary metabolite biosynthesis potential. *PLoS ONE*, 9, e96719. DOI: 10.1371/journal.pone.0096719.
- IGARASHI, M.; SAWA, R.; UMEKITA, M.; HATANO, M.; ARISAKA, R.; HAYASHI, C.; ISHIZAKI, Y.; SUZUKI, M.; KATO, C. (2021). Sealutomicins, new enediyne antibiotics from the deep-sea actinomycete *Nonomuraea* sp. MM565M-173N2. *J. Antibiot.*, 74, 291–299. [CrossRef]. DOI: [10.1038/s41429-020-00402-1](https://doi.org/10.1038/s41429-020-00402-1).
- IMAMURA, N.; NISHIJIMA, M.; ADACHI, K.; SANO, H. (1993). Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *J Antibiot (Tokyo)*, 46, 241–246. DOI: 10.7164/antibiotics.46.241 [PubMed: 8468237].
- INDRANINGRAT, A. A. G.; MICHELLER, S.; RUNDERKAMP, M.; SAUERLAND, I.; BECKING, L. E.; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. (2019). Cultivation of sponge-associated bacteria from *Agelas sventres* and *Xestospongia muta* collected from different depths. *Mar. Drugs*, 17, 578. DOI: 10.3390/md17100578.
- INDRANINGRAT, A. A. G.; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. (2016). Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds. *Mar. Drugs.*, 14, 87. DOI: 10.3390/md14050087.
- INIYAN, A. M.; WINK, J.; LANDWEHR, W.; RAMPRASAD, E. V. V.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C.; BUNK, B.; JOSEPH, F. R. S.; JOSHUA, S. A.; SHYL, E. S. D.; KANNAN, R. R.; VINCENT, S. G. P. (2021). *Streptomyces marianii* sp. nov., a novel marine actinomycete from southern coast of India. *J. Antibiot.*, 74, 59–69. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0360-z>.

JAGANNATHAN, S.V.; MANEMANN, E.M.; ROWE, S.E.; CALLENDER, M.C.; SOTO, W. (2021). Marine Actinomycetes, New Sources of Biotechnological Products. *Mar. Drugs*, 19, 365. <https://doi.org/10.3390/md19070365>.

JAKUBIEC-KRZESNIAK, K.; RAJNISZ-MATEUSIAK, A.; GUSPIEL, A.; ZIEMSKA, J.; SOLECKA, J. (2018). Secondary Metabolites of Actinomycetes and their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. *Pol J Microbiol.*, 67(3), 259-272. DOI: 10.21307/pjm-2018-048. PMID: 30451442; PMCID: PMC7256786.

JAMAL, M.T.; SATHEESH, S. (2022). Antibiofilm activity of secondary metabolites of sponge-associated bacterium *Alcanivorax* sp. from the Red Sea. *Front. Mar. Sci.* 9, 980418. DOI: 10.3389/fmars.2022.980418.

JENSEN, P. R.; DWIGHT, R.; FENICAL, W. (1991). Distribution of actinomycetes in nearshore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1102-1108. DOI: [10.1128/aem.57.4.1102-1108.1991](https://doi.org/10.1128/aem.57.4.1102-1108.1991).

JENSEN, P. R.; GONTANG, E.; MAFNAS, C.; MINCER, T. C.; FENICAL, W. (2005a). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol*, 7, 1039–1048. DOI:10.1111/j.1462-2920.2005.00785.x.

JENSEN, P. R.; MINCER, T.; FENICAL, W. (2005b). Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7019–7028. DOI: [10.1128/AEM.71.11.7019-7028.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7019-7028.2005).

JIANG, Y. J.; ZHANG, D. S.; ZHANG, H. J.; LI, J. Q.; DING, W. J.; XU, C. D.; MA, Z. J.; (2018). Medermycin-type naphthoquinones from the marine-derived *Streptomyces* sp. XMA39. *J Nat Prod*, 81, 2120–2124. DOI:10.1021/acs.jnatprod.8b00544 [PubMed: 30209946].

JIANG, Y.; WEI, X.; CHEN, X.; JIANG, Y.; XUE, Q.; LAI, H.; JIANG, C. (2016). *Saccharopolyspora griseoalba* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the dead sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109, 1635–1641. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1007/s10482-016-0763-9](https://doi.org/10.1007/s10482-016-0763-9).

JIANG, Z.; ZHANG, W. H.; YUAN, C. G.; CHEN, J. Y.; CAO, L. X.; PARK, D. J.; XIAO, M.; KIM, C. J.; LI, W. J. (2015). *Kocuria subflava* sp. nov., isolated from marine sediment from the Indian Ocean. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108, 1349–1355. [CrossRef]. DOI: [10.1007/s10482-015-0587-z](https://doi.org/10.1007/s10482-015-0587-z).

JIAO, W. H.; YUAN, W.; LI, Z. Y.; LI, J.; LI, L.; SUN, J. B.; GUI, Y. H.; WANG, J.; YE, B. P.; LIN, H. W. (2018). Anti-MRSA actinomycins D1–D4 from the marine sponge-associated *Streptomyces* sp. LHW52447. *Tetrahedron*, 74, 5914–5919. DOI:10.1016/j.tet.2018.08.023.

JIZBA, J.; SEDMERA, P.; ZIMA, J.; BERAN, M.; BLUMAUEROVÁ, M.; KANDYBIN, N.; SAMOUKINA, G. (1991). Macrotetrolide antibiotics produced by *Streptomyces globisporus*. *Folia Microbiol (Praha)*, 36, 437–443. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02884062>.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN J. L.; DASZAK, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.*, 451, 990–993. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06536>.

- JOSE, P. A.; ROBINSON, S.; JEBAKUMAR, D. (2012). Phylogenetic diversity of actinomycetes cultured from coastal multipond solar saltern in Tuticorin, India. *Aquat. Biosyst*, 8, 23. DOI: <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-23>.
- KADAIKUNNAN, S.; ALHARBI, N. S.; KHALED, J. M.; ALOBAIDI, A. S.; RAJIVGANDHI, G. N.; RAMACHANDRAN, G.; GNANASEKARAN, C.; CHELLIAH, C. K.; ALANZI, K. F.; MANOHARAN, N. (2021). Partially purified actinomycetes compounds enhance the intracellular damages in multidrug resistant *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 11, 6057-6062, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.061>.
- KALAKOUTSKII, L. V.; AGRE, N. S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol Rev*, 40, 469–525. DOI: [10.1128/br.40.2.469-524.1976](https://doi.org/10.1128/br.40.2.469-524.1976).
- KAMJAM, M.; SIVALINGAM, P.; DENG, Z.; HONG, K. (2017). Deep Sea Actinomycetes and Their Secondary Metabolites. *Front Microbiol*, 8, 1-9. DOI: [10.3389/fmicb.2017.00760](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00760).
- KÄMPFER, P.; GLAESER, S.P.; BUSSE, H.J.; ABDELMOHSEN, U.R.; AHMED, S.; HENTSCHEL, U. (2015). *Actinokineospora spheciospongiae* sp. nov., isolated from the marine sponge *Spheciospongia vagabunda*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 879–884. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.000031](https://doi.org/10.1099/ijs.0.000031).
- KÄMPFER, P.; GLAESER, S.P.; BUSSE, H.J.; ABDELMOHSEN, U.R.; HENTSCHEL, U. (2014). *Rubrobacter aplysinae* sp. nov., isolated from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 705–709. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.055152-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.055152-0).
- KANEDA, M.; NAID, T.; KITHARA, T.; NAKAMURA, S.; KITAHARA, T.; NAKAMURA, S. (1988). Carbazomycins G and H, novel carbazomycin congeners containing a quinol moiety. *J. Antibiot.*, 45, 602–608. DOI: [10.7164/antibiotics.41.602](https://doi.org/10.7164/antibiotics.41.602).
- KARTHICK, P.; MOHANRAJU, R. (2018). Antimicrobial potential of epiphytic bacteria associated with seaweeds of little andaman, india. *Front. Microbiol.*, 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00611.
- KARTHIK, L.; KUMAR, G.; RAO, B. (2010). Diversity of marine actinomycetes from Nicobar marine sediments and its antifungal activity. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2, 199–203. <https://www.researchgate.net/publication/201940218>.
- KARUPPIAH, P.; MUSTAFFA, M. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of Musa sp. leaf extracts against multidrug-resistant clinical pathogens causing nosocomial infection. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(9), 737–742. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60148-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60148-3).
- KEMUNG, H. M.; TAN, L. T.; KHAN, T. M.; CHAN, K. G.; PUSPARAJAH, P.; GOH, B. H.; LEE, L. H. (2018). *Streptomyces* as a prominent resource of future anti-MRSA drugs. *Frontiers in Microbiology*, 9, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02221>.
- KEMUNG, H. M.; TAN, L. T. H.; CHAN, K. G.; SER, H. L.; LAW, J. W. F.; LEE, L. H.; GOH, B. H. (2020). *Streptomyces* sp. strain MUSC 125 from mangrove soil in Malaysia with anti-MRSA, anti-biofilm, and antioxidant activities. *Molecules*, 25, <https://doi.org/10.3390/molecules25153545>.

- KHALIL, Z. G.; RAJU, R.; PIGGOTT, A. M.; SALIM, A. A.; BLUMENTHAL, A.; CAPON, R. J. (2015). Aranciamycins I and J, Antimycobacterial Anthracyclines from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. *J Nat Prod*, 78, 949–952. DOI:10.1021/acs.jnatprod.5b00095 [PubMed: 25789410].
- KHAN, S. N.; KHAN, A. U. (2016). Breaking the Spell: Combating Multidrug Resistant ‘Superbugs’. *Front. Microbiol.*, 7, 174. [CrossRef]. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00174](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00174).
- KIM, S. B.; LONSDALE, J.; SEONG, C. N.; GOODFELLOW, M. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83, 107–116. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1023397724023>.
- KIM, T. K.; HEWAVITHARANA, A. K.; SHAW, P. N.; FUERST, J. A. (2006). Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl Environ Microbiol.*, 72, 2118–2125. DOI: [10.1128/AEM.72.3.2118-2125.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2118-2125.2006).
- KINASHI, H. (2011). Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J. Antibiot.*, 64, 19–25. DOI: 10.1038/ja.2010.146.
- KIRAN, G. S.; SEKAR, S.; RAMASAMY, P.; THINESH, T.; HASSAN, S.; LIPTON, A. N.; NINAWA, A. S.; SELVIN, J. (2018). Marine sponge microbial association: Towards disclosing unique symbiotic interactions. *Mar. Environ. Res.*, 140, 169–179. DOI: 10.1016/j.marenvres.2018.04.017.
- KIRBY, R. (2011). Chromosome diversity and similarity within the Actinomycetales. *FEMS Microbiol Lett*, 319, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02242.x>.
- KOMAKI, H.; SAKURAI, K.; HOSOYAMA, A.; KIMURA, A.; IGARASHI, Y.; TAMURA, T. (2018). Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene clusters among taxonomically close *Streptomyces* strains. *Scientific Reports*, 8, 6888. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24921-y>.
- KRISHNAMOORTHY, M.; DHARMARAJ, D.; RAJENDRAN, K.; KARUPPIAH, K.; BALASUBRAMANIAN, M.; ETHIRAJ, K. (2020). Pharmacological activities of coral reef associated actinomycetes, *Saccharopolyspora* sp. IMA1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101748. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101748.
- KUMAR, N.; SINGH, R. K.; MISHRA, S. K.; SINGH, A. K.; PACHOURI, U. C. (2010). Isolation and screening of soil actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *Inter J Microbio Res*, 2(2), 12–16. <https://doi.org/10.9735/0975-5276.2.2.12-16>.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., & TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- KUNZ, A. L.; LABES, A.; WIESE, J.; BRUHN, T.; BRINGMANN, G.; IMHOFF, J. F. (2014). Nature’s lab for derivatization: new and revised structures of a variety of streptophenazines produced by a sponge-derived *Streptomyces* strain. *Mar Drugs*, 12, 1699–1714. DOI:10.3390/md12041699 [PubMed: 24670532].

- KUO, J.; YANG, Y. T.; LU, M. C.; WONG, T. Y.; SUNG, P. J.; HUANG, Y. S. (2019). Antimicrobial activity and diversity of bacteria associated with Taiwanese marine sponge *Theonella swinhoei*. *Ann. Microbiol.*, 69, 253–265. DOI: 10.1007/s13213-018-1414-3.
- KURTBÖKE D. İPEK. (2022). Correct interpretation of actinomycete imagery using scanning electron microscopy. *Microbiology Australia*, 43, 28-31. <https://doi.org/10.1071/MA22009>.
- LABEDA, D. P.; TESTA, R. T.; LECHEVALIER, M. P.; LECHEVALIER, H. A. (1984). *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 426– 431. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-4-426>.
- LABEDA, D.; (1987). Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Dev Ind Microbiol*, 28, 115–121. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:35541136>.
- LACRET, R.; OVES-COSTALES, D.; GÓMEZ, C.; DÍAZ, C.; DE LA CRUZ, M.; PÉREZ-VICTORIA, I.; VICENTE, F.; GENILLOU, O.; REYES, F. (2014). New ikarugamycin derivatives with antifungal and antibacterial properties from *Streptomyces zhaozhouensis*. *Mar Drugs.*, 13, 128–140. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]. DOI: [10.3390/md13010128](https://doi.org/10.3390/md13010128).
- LACRET, R.; OVES-COSTALES, D.; GOMEZ, C.; GÓMEZ, C.; DIAZ, C.; LA CRUZ M. D.; PEREZVICTORIA, I.; VICENTE, F.; GENILLOU, O.; REYES, F. (2015). New ikarugamycin derivatives with antifungal and antibacterial properties from *Streptomyces zhaozhouensis*. *Mar Drugs*, 13, 128–140. DOI:10.3390/md13010128.
- LAI, H.; JIANG, Y.; CHEN, X.; LI, Q.; JIANG, C.; JIANG, Y.; WEI, X. (2017). *Haloactinomyces albus* gen. nov., sp. nov., isolated from the dead sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67, 1163–1168. [PubMed]. DOI: [10.1099/ijsem.0.001783](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001783).
- LAI, H.; WEI, X.; JIANG, Y.; CHEN, X.; LI, Q.; JIANG, Y.; JIANG, C.; GILLERMAN, L. (2014). *Halopolyspora alba* gen. nov., sp. nov., isolated from sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2775–2780. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijse.0.057638-0](https://doi.org/10.1099/ijse.0.057638-0).
- LAI, Q.; ZHOU, Z.; LI, G.; LI, G.; SHAO, Z. (2016). *Alcanivorax nanhaiticus* sp. nov., isolated from deep sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 3651–3655. DOI: 10.1099/ijsem.0.001247.
- LAM, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol.*, 9, 245–251. DOI: [10.1016/j.mib.2006.03.004](https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.03.004).
- LAW, J. W. F.; CHAN, K. G.; HE, Y.W.; KHAN, T. M.; MUTALIB, N. A.; GOH, B.; LEE, L. (2019b). Diversity of *Streptomyces* spp. from mangrove forest of Sarawak (Malaysia) and screening of their antioxidant and cytotoxic activities. *Sci Rep*, 9, 15262. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51622-x>.
- LAW, J. W.; SER, H. L.; DUANGJAI, A.; SAOKAEW, S.; BUKHARI, S. I.; KHAN, T. M.; MUTALIB, N. S.; CHAN, K. G.; GOH, B. H.; LEE, L. H. (2017). *Streptomyces colonosans* sp. nov., A Novel Actinobacterium Isolated from Malaysia Mangrove Soil Exhibiting Antioxidative Activity and Cytotoxic Potential against Human Colon Cancer Cell Lines. *Front. Microbiol.*, 8, 877. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00877>.
- LAW, J. W.; SER, H. L.; MUTALIB, N. S.; SAOKAEW, S.; DUANGJAI, A.; KHAN, T. M.; CHAN, K. G.; GOH, B. H.; LEE, L. H. (2019a). *Streptomyces monashensis* sp. nov., a

novel mangrove soil actinobacterium from East Malaysia with antioxidative potential. *Sci. Rep.*, 9, 3056. DOI: [10.1038/s41598-019-39592-6](https://doi.org/10.1038/s41598-019-39592-6).

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. (1965). Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. *Ann Inst Pasteur*, 108, 662–673. (In French.). PMID: 5838643.

LEE, D. W.; LEE, A. H.; LEE, H.; KIM, J. J.; KHIM, J. S.; YIM, U. H.; KIM, B. S. (2017). *Nocardioides litoris* sp. nov., isolated from the Taean seashore. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67, 2332–2336. [CrossRef]. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001954>.

LEÓN, J., APONTE, J., ROJAS, R., CUADRA, D., AYALA, N., TOMÁS, G., GUERRERO, M. (2011). 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*, 28(2). <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.282.489>.

LEÓN J, APONTE J, CUADRA DLOURDES, GALINDO N, JARAMILLO LIZ, VALLEJO M, MARGUET E. (2016). Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Rev Biol Mar Ocean*. 51(1): 69-80. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572016000100007>

LEÓN JORGE Y PATRICIO GARCÍA-TELLO. (1998). Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Revista Peruana de Biología* 5 (1), 047 - 064. <https://doi.org/10.15381/rpb.v5i1.8320>

LEÓN, JORGE, LIBIA LIZA, ISELA SOTO, CUADRA D'LOURDES, LILIAN PATIÑO, Y RITO ZERPA. (2007). Actinomicetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana De Biología* 14 (2), 259-70. <https://doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1796>

LEWIS, K. (2020). The science of antibiotic discovery. *Cell*, 181, 29–45. [CrossRef].

LI, L.; WANG, J.; ZHOU, Y. J.; LIN, H. W.; LU, Y. H. (2019). *Streptomyces reniochaliniae* sp. nov. and *Streptomyces diacarni* sp. nov., from marine sponges. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 69, 99–104. DOI: [10.1099/ijsem.0.003109](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003109).

LI, Z; SUN, W.; ZHANG, F.; HE, L.; LOGANATHAN, K. (2015). Actinomicetes from the South China Sea sponges: Isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery. *Frontiers in Microbiology.*, 6, 1048. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01048>.

LIANG, J.; SHE, J.; FU, J.; WANG, J.; YE, Y.; YANG, B.; LIU, Y.; ZHOU, X.; TAO, H. (2023). Advances in Natural Products from the Marine-Sponge-Associated Microorganisms with Antimicrobial Activity in the Last Decade. *Marine drugs*, 21(4), 236. <https://doi.org/10.3390/md21040236>.

LIANG, Y.; XIE, X.; CHEN, L.; YAN, S. L.; YE, X. W.; ANJUM, K. A.; HUANG, H. C.; LIAN, X. Y.; ZHANG, Z. Z. (2016). Bioactive polycyclic quinones from marine *Streptomyces* sp. 182SMLY. *Mar Drugs*, 14, 1–11. DOI:10.3390/md14010010.

LIAO, X.; LAI, Q.; YANG, J.; DONG, C.; LI, D.; SHAO, Z. (2020). *Alcanivorax sediminis* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of the Pacific Ocean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 4280–4284. DOI: 10.1099/ijsem.0.004285.

- LOCCI, R.; SCHAAL, K. P. (1980). Apical growth in facultative anaerobic actinomycetes as determined by immunofluorescent labeling. *Zentralbl Bakteriol A*, 246, 112–118. [https://doi.org/10.1016/S0172-5599\(80\)80102-7](https://doi.org/10.1016/S0172-5599(80)80102-7).
- LUDWIG, W.; EUZÉBY, J.; SCHUMANN, P.; BUSS, H. J.; TRUJILLO, M. E.; KÄMPFER, P.; WHITEMAN, W. B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. In Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H. J.; Trujillo, M. E.; Suzuki, K. I.; Ludwig, W.; Whitman, W. B. (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer-Verlag, New York, NY. 1–28. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4_1.
- MA, G. Q.; XIA, Z. F.; WAN, C. X.; ZHANG, Y.; LUO, X. X.; ZHANG, L. L. (2017). *Streptomyces kalpinensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a saltwater beach. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67, 4892–4896. DOI: [10.1099/ijsem.0.002125](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002125).
- MA, G. Q.; XIA, Z. F.; ZHANG, Y.; WAN, C. X.; LUO, X. X.; ZHANG, L. L. (2016). *Streptomyces litoralis* sp. nov., isolated from a saltwater beach. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 5051–5055. DOI: [10.1099/ijsem.0.001468](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001468).
- MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. D. S.; DE SOUZA, J. T.; POMECCA, A. W.V. (2006). Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, 3, 122–132. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02981312>.
- MAHEJBIN, S.; DALIP, S. R.; SANGEETA, G.; SATYA, P. S. (2019). Cultivation and characteristics of the Marine Actinobacteria from the Sea water of Alang. Bhavnagar. *Indian J. Mar. Sci.*, 48(12), 1896–1901. <https://www.researchgate.net/publication/346962330>.
- MAJITHIYA, V.; GOHEL, S. (2022). Actinobacteria Associated with Marine Invertebrates: Diversity and Biological Significance. *Actinobacteria - Diversity, Applications and Medical Aspects*. DOI: 10.5772/intechopen.106642.
- MALDONADO, L. A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; MINCER, T. J.; WARD, A. C.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M. (2005a). *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1759-1766. DOI: [10.1099/ijms.0.63625-0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.63625-0).
- MALDONADO, L. A.; STACH, J. E. M.; PATHOM-AREE, W.; WARD, A. C.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M. (2005b). Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Anton Leeuwenhoek.*, 87:11–18. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6525-0>.
- MALLA, M. A.; DUBEY, A. K.; KUMAR, A.; YADAV, P. (2021). *Streptomyces* as a source of antifungal metabolites: A review. *J. Appl. Microbiol.*, 131, 1549–1560.
- MANIVASAGAN, P.; KANGA, K. H.; SIVAKUMAR, K.; LI-CHANG, E. C. Y.; OHA, H. M.; KIM, S. K. (2014a). Marine actinobacteria: An important source of bioactive natural products. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 38, 172–188. [CrossRef][PubMed]. DOI: [10.1016/j.etap.2014.05.014](https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.014).
- MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S. K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research*, 168, 311-332. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.002>.

- MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S. K. (2014b). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 169(4), 262-278. DOI: 10.1016/j.micres.2013.07.014.
- MARGASSERY, L. M.; KENNEDY, J.; O'GARA, F.; DOBSON, A. D. W.; MORRISSEY, J. P. (2012). Diversity and antibacterial activity of bacteria isolated from the coastal marine sponges *Amphilectus fucorum* and *Eurypon major*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 55, 2–8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03256.x.
- MAST, Y.; EVI S. (2019). "Actinomycetes: The Antibiotics Producers" *Antibiotics*, 8(3), 105. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030105>.
- MATOBOLÉ, R. M.; VAN ZYL, L. J.; PARKER-NANCE, S.; DAVIES-COLEMAN, M. T.; TRINDADE, M. (2017). Antibacterial Activities of Bacteria Isolated from the Marine Sponges *Isodictya compressa* and *Higginsia bidentifera* Collected from Algoa Bay, South Africa. *Mar. Drugs*, 15, 47. DOI: 10.3390/md15020047.
- MATSUMOTO, A.; KASAI, H.; MATSUO, Y.; SHIZURI, Y.; ICHIKAWA, N.; FUJITA, N.; OMURA, S.; TAKAHASHI, Y. (2013). *Ilumatobacter nonamiense* sp. nov. and *Ilumatobacter coccineum* sp. nov., isolated from seashore sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 3404–3408. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.047316-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.047316-0).
- MAWLANKAR, R. R.; MUAL, P.; SONALKAR, V. V.; THORAT, M. N.; VERMA, A.; SRINIVASAN, K.; DASTAGER, S. G. (2015). *Microbacterium enclense* sp. nov., isolated from sediment sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 2064–2070. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.000221](https://doi.org/10.1099/ijs.0.000221).
- MAYFIELD, C. I.; WILLIAMS, S. T.; RUDDICK, S. M.; HATFIELD, H. L. (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol Biochem*, 4, 79 –91. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90045-4).
- MEDEMA, M. H.; KOTTMANN, R.; YILMAZ, P.; CUMMINGS, M.; BIGGINS, J. B.; BLIN, K.; DE BRUIJN, I.; CHOOI, Y. H.; CLAESEN, J.; COATES, R. C.; *et al.* (2015). Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nat. Chem. Biol.*, 11, 625–631. [CrossRef]. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1890>.
- MEHBUB, M. F.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. (2014). Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. *Marine Drugs*, 12, 4539-4577. DOI: [10.3390/md12084539](https://doi.org/10.3390/md12084539).
- MINCER, T. J.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5005–5011. DOI: [10.1128/AEM.68.10.5005-5011.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5005-5011.2002).
- MITOVA, M. I.; LANG, G.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. (2008). Subinhibitory concentrations of antibiotics induce phenazine production in a marine *Streptomyces* sp. *J Nat Prod*, 71, 824–827. DOI:10.1021/np800032a [PubMed: 18396903].
- MOBEEN, S. K.; GIRIJA SANKAR, G. (2018). Bioprocess development employing design of experiments for antibiotic production from *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *Indian J. Pharm. Sci.*, 80, 9. DOI:[10.4172/PHARMACEUTICAL-SCIENCES.1000438](https://doi.org/10.4172/PHARMACEUTICAL-SCIENCES.1000438).

- MONDAL, H., & THOMAS, J. (2022). Isolation and Characterization of a Novel Actinomycete Isolated from Marine Sediments and Its Antibacterial Activity against Fish Pathogens. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(11), 1546. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111546>.
- MOON, K.; CHUNG, B.; SHIN, Y.; RHEINGOLD, A. L.; MOORE, C. E.; PARK, S. J.; PARK, S.; LEE, S. K.; OH, K.; SHIN, J.; OH, D. (2015). Pentacyclic antibiotics from a tidal mud flat–derived actinomycete. *J Nat Prod*, 78, 524–529. DOI:10.1021/np500736b [PubMed: 25495422]
- MORAN, M. A.; RUTHERFORD, L. T.; HODSON, R. E. (1995). Evidence for indigenous *Streptomyces* population in a marine environment determined with a RNAr 16S probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3695–3700. DOI: [10.1128/aem.61.10.3695-3700.1995](https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3695-3700.1995).
- MUKHERJEE, G.; SEN, S. (2004). Characterization and identification of chitinase producing *Streptomyces venezuelae* P10. *Indian J. Exp. Biol.* 42, 541-544. <http://nopr.niscares.in/handle/123456789/23448>.
- MUKHERJEE, S. (2017). Emerging infectious diseases: epidemiological perspective. *Indian J Dermatol.*, 62(5), 459-67. DOI: [10.4103/ijd.IJD_379_17](https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_379_17).
- NAINE, S. J.; DEVI, C. S.; MOHANASRINIVASAN, V. (2015). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. *Braz Arch Biol Technol.*, 58, 198–27. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201400173>.
- NAIR, S.; ABRAHAM, J. (2020). Natural Products from Actinobacteria for Drug Discovery. In *Advances in Pharmaceutical Biotechnology*; Springer: Singapore, 333–363. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-15-2195-9_23.
- NANDHINI, S. U.; BHARATHY, P. J.; REKHA, S. (2015). “ANTI FUNGAL COMPOUNDS FROM MARINE STREPTOMYCES”. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 207-9. <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ijpps/article/view/3411>.
- NGAMCHARUNGCHIT, C.; CHAIMUSIK, N.; PANBANGRED, W.; EUANORASETR, J.; INTRA, B. (2023). Bioactive Metabolites from Terrestrial and Marine Actinomycetes. *Molecules*, 28, 5915. <https://doi.org/10.3390/molecules28155915>.
- NOROUZI, H.; DANESH, A.; MOHSENI, M.; KHORASGANI, M. R. (2018). Marine actinomycetes with probiotic potential and bioactivity against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Mol. Cell. Med.*, 7, 44–52. [PubMed]. DOI: [10.22088/IJMCM.BUMS.7.1.44](https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.1.44).
- NOURA, A. N.; ASHRAF, A. A. B.; MAMDOUH, A. M.; NOURA, S. N. (2017). In vitro activity, extraction, separation and structure elucidation of antibiotic produced by *Streptomyces anulatus* NEAE-94 active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 31(2), 418–430. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1276412>.
- NURFATHIAH, A. M.; AHMED, J. K.; CHOWDHURY, Z. Z.; ZAIMA, A. Z. A. (2014). Selective isolation of actinomycetes from Mangrove Forest of Pahang, Malaysia. *International Conference on Agriculture, Biology and Environmental Sciences (ICABES 14)* Dec., 8-9. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051244>.

- OCHI, K. (1995). Phylogenetic analysis of mycolic acid-containing wall chemotype IV actinomycetes and allied taxa by partial sequencing of ribosomal protein AT-L30. *Int J Syst Bacteriol*, 45, 653–660. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-45-4-653>.
- OKAMI, Y.; HOTTA, K. (1988). Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M; Williams, S. T.; Mordaski, M. editors. *Actinomycetes in biotechnology*. London: Academic Press., 33–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-289673-6.50007>.
- OLGA, G. (2018). Mining Actinomycetes for Novel Antibiotics in the Omics Era: Are We Ready to Exploit This New Paradigm? *Antibiotics*. 7, 85. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040085>.
- OMURA, S.; CRUMP, A. (2014). Ivermectin: panacea for resource-poor communities? *Trends Parasitol*, 30, 445–455. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.005>.
- OREN, A.; GARRITY, G. M. (2021). “Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 71(10): 005056. DOI: [10.1099/ijsem.0.005056](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056).
- OTTO-HANSON, L. K.; KINKEL, L. L. (2020). Densities and inhibitory phenotypes among indigenous *Streptomyces* spp. vary across native and agricultural habitats. *Microb. Ecol.* 79, 694–705. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01443-2>.
- OUYANG A, CHANG Y (2011). A method to type the potential angucycline producers in actinomycetes isolated from marine sponges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99(4):807–815. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9554-5>
- PACIOS, S.; AGUILAR, C. N.; ALVAREZ, O. B.; RODRIGUEZ, R.; CHÁVEZ, M.; ARREDONDO, R.; ASCACIO, J. A.; GOVEA, M.; ILYINA, A. (2021). Application of *Streptomyces* Antimicrobial Compounds for the Control of Phytopathogens. *Front. Sustain. Food Syst.*, 5, 696518. DOI: 10.3389/fsufs.2021.696518.
- PADEROG, M. J. V.; SUAREZ, A. F. L.; SABIDO, E. M.; LOW, Z. J.; SALUDES, J. P.; DALISAY, D. S. (2020). Anthracycline Shunt Metabolites From Philippine Marine Sediment-Derived *Streptomyces* Destroy Cell Membrane Integrity of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.*, 11, 743. [CrossRef]. DOI: [10.3389/fmicb.2020.00743](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00743).
- PAN, H. Q.; CHENG, J.; ZHANG, D. F.; YU, S. Y.; KHIEU, T. N.; SON, C. K.; JIANG, Z.; HU, J. C.; LI, W. J. (2015a). *Streptomyces bohaisensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from *Scomberomorus niphonius* in the Bohai Sea. *J. Antibiot.*, 68, 246–252. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2014.137>.
- PAN, H. Q.; ZHANG, D. F.; LI, L.; JIANG, Z.; CHENG, J.; ZHANG, Y. G.; WANG, H. F.; HU, J. C.; LI, W. J. (2015b). *Nocardiopsis oceani* sp. nov. and *Nocardiopsis nanhaiensis* sp. nov., actinomycetes isolated from marine sediment of the South China Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 3384–3391. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijsem.0.000425](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000425).
- PARK, S.; JUNG, Y. T.; WON, S. M.; LEE, J. S.; YOON, J. H. (2015). *Demequina activiva* sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 2042–2047. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijse.0.000217](https://doi.org/10.1099/ijse.0.000217).

- PARK, S.; JUNG, Y. T.; WON, S. M.; YOON, J. H. (2016). *Demequina litorisediminis* sp. nov., isolated from a tidal flat, and emended description of the genus *Demequina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 4197–4203. DOI: [10.1099/ijsem.0.001335](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001335).
- PARTE, A. C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; REIMER, L. C.; GÖKER, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70, 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>.
- PARTHASARATHI, S.; SATHYA, G.; BUPESH, R.; SAMY, D.; MOHAN, R.; KUMAR, S.; MANIKANDAN, M.; KIM, C.; BALAKRISHNAN, K. (2012). Isolation and characterization of antimicrobial compound from marine *Streptomyces hygroscopicus* BDUS 49. *World J. Fish Mar. Sci.*, 4, 268–277. DOI: 10.5829/idosi.wjfm.2012.04.03.5658.
- PATIL, R.; JAYASEKHARAN, G.; SHANMUGHAM, S.; SHAKILA, R. J. (2001). Control of bacterial pathogens associated with fish diseases by antagonistic marine actinomycetes isolated from marine sediments. *Indian J. Mar. Sci.*, 30, 264–267. <https://www.researchgate.net/publication/242288831>.
- PATIN, N. V.; SCHORN, M.; AGUINALDO, K.; LINCECUM, T.; MOORE, B. S.; JENSEN, P. R. (2017). Effects of Actinomycete Secondary Metabolites on Sediment Microbial Communities. *Applied and environmental microbiology*, 83, e02676-e02816. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02676-16>.
- PEELA, S.; BAPIRAJU, K.; TERLI, R. (2005). Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 583–585. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-004-3493-5>.
- PÉREZ F, LEÓN J, GALINDO N. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes). *Rev. Mex. Fitopatol.* 33 (2): 116-139.
- PÉREZ ESTEVE, E.; RIVAS SOLER, A. (2021). Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria por métodos fenotípicos. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/167611>
- PÉREZ-VICTORIA, I.; OVES-COSTALES, D.; LACRET, R.; MARTÍN, J.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; DÍAZ, C.; REYES, F. (2019). Structure elucidation and biosynthetic gene cluster analysis of caniferolides A–D, new bioactive 36-membered macrolides from the marine-derived *Streptomyces caniferus* CA-271066. *Org. Biomol. Chem.*, 17, 2954–2971. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8OB03115K>.
- PHONGSOPITANUN, W.; KUDO, T.; MORI, M.; SHIOMI, K.; PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUWANBORIRUX, K.; TANASUPAWAT, S. (2015). *Micromonospora fluostatini* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 4417–4423. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijsem.0.000589](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000589).
- PHONGSOPITANUN, W.; KUDO, T.; OHKUMA, M.; PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUWANBORIRUX, K.; TANASUPAWAT, S. (2016). *Streptomyces verrucosusporus* sp. nov., isolated from marine sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 3607–3613. DOI: [10.1099/ijsem.0.001240](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001240).

- PIEL, J. (2004). Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 519–538. DOI: [10.1039/b703499g](https://doi.org/10.1039/b703499g).
- PISANO, M. A.; SOMMER, M. J.; LOPEZ, M. M. (1986). Application of Pretreatments for the Isolation of Bioactive Actinomycetes from Marine Sediments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 285-288. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00253664>.
- PISANO, M. A.; SOMMER, M. J.; TARAS, L. (1992). Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 36, 553–555. <https://doi.org/10.1007/BF00170202>.
- PRAKASH, DIVYA & NAWANI, NEELU. (2014). A rapid and improved technique for scanning electron microscopy of actinomycetes. *Journal of Microbiological Methods*. 99. 10.1016/j.mimet.2014.02.005.
- PRAUSER, H.; LECHEVALIER, M. P.; LECHEVALIER, H. (1970). Description of *Oerskovia* gen. n. to harbor Orskov's motile *Nocardia*. *Appl Microbiol*, 19, 534. DOI: [10.1128/am.19.3.534-534.1970](https://doi.org/10.1128/am.19.3.534-534.1970).
- PRIDHAM, T. G.; HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. (1958). A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Appl Microbiol*, 6, 52–79. DOI: [10.1128/am.6.1.52-79.1958](https://doi.org/10.1128/am.6.1.52-79.1958).
- PRIDHAM, T. G.; TRESNER, H. D. (1974). Family VII. Streptomycetaceae, In: Buchanan, R. E., Gibbons, W. E. (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 747–748. [[Google Scholar](#)].
- PRIETO-DAVÓ, A.; DIAS, T.; GOMES, S. E.; RODRIGUES, S.; PARERA-VALADEZ, Y.; BORRALHO, P. M.; PEREIRA, F.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS-SANCHES, I.; GAUDENCIO, S. P. (2016). The Madeira Archipelago As a Significant Source of Marine-Derived Actinomycete Diversity with Anticancer and Antimicrobial Potential. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01594>.
- PRIETO-DAVÓ, A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. (2008). Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquat. Microb. Ecol.*, 52, 1-11. DOI: 10.3354/ame01211.
- PROCOPIO, R. E.; SILVA, I. R.; MARTINS, M. K; et al. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.*, 16, 466–71. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>.
- PUENTE-SÁNCHEZ, F.; SÁNCHEZ-ROMÁN, M.; AMILS, R.; PARRO, V. (2014). *Tessaracoccus lapidcaptus* sp. nov., an actinobacterium isolated from the deep subsurface of the Iberian pyrite belt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 3546–3552. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.060038-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.060038-0).
- QASIM, S. Z. (1999). The Indian Ocean: images and realities. *New Delhi: Oxford and IBH*, 57–90. ISBN-10. 8120413806.
- QUINN, G. A.; BANAT, A. M.; ABDELHAMEED, A. M.; BANAT, I. M. (2020). *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. *J. Med. Microbiol.*, 69, 1040–1048. doi: [10.1099/jmm.0.001232](https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232).
- RAHMAN, M. A.; ZAHIDUL ISLAM, M.; ISLAM, M. A. UI. (2011). Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. *BioTech Res Int.*, ID 857925, 1-6. <https://doi.org/10.4061/2011/857925>.

- RAMESH, C.; TULASI, B. R.; RAJU, M.; THAKUR, N.; DUFOSSÉ, L. (2021). Marine natural products from tunicates and their associated microbes. *Marine Drugs*, 19(6), 308. DOI: 10.3390/md19060308.
- RAMESH, S.; JAYAPRAKASHVEL, M.; MATHIVANAN, N. (2006). Microbial status in seawater and coastal sediments during pre and post tsunami periods in the Bay of Bengal, India. *Mar. Ecol.* 27, 198–203.
- RAMESH, S.; MATHIVANAN, N. (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 2103–2111. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0113-4>.
- RANGSEEKAEW, P.; PATHOM-AREE, W. (2019). Cave Actinobacteria as Producers of Bioactive Metabolites. *Front. Microbiol.*, 10, 387. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00387.
- RANTE, H.; ALAM, G.; USMAR; ZAHRA, S.; KURNIAWATI, A.; ALI, A. (2022). Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. sponge-associated isolated from Samalona Island of South Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas* 23, 3, 1392 – 1398. DOI: 10.13057/biodiv/d230325.
- RASHAD, F. M.; FATHY, H. M.; EL-ZAYAT, A. S.; ELGHONAIMY, A. M. (2015). Isolation and Characterization of Multifunctional *Streptomyces* Species with Antimicrobial, Nematicidal and Phytohormone Activities from Marine Environments in Egypt. *Microbiol. Res.*, 175, 34–47. [CrossRef]. DOI: [10.1016/j.micres.2015.03.002](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002).
- RAY, L.; MISHRA, S. R.; PANDA, A. N.; DAS, S.; RASTOGI, G.; PATTANAIK, A. K.; ADHYA, T. K.; SUAR, M.; RAINA, V. (2016). *Streptomyces chitinivorans* sp. nov., a chitinolytic strain isolated from estuarine lake sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 3241–3248. DOI: [10.1099/ijsem.0.001176](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001176).
- REBOLLO GARCÍA, L.; RINCÓN ELVIRA, E. E.; LEÓN GÓMEZ, V. E.; GARCÍA MURCIEGO, M. E. G. (2021). Las enfermedades emergentes y reemergentes del siglo XXI. *SANUM*, 5(1) 48-61.
- REYGAERT, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.*, 26, 4(3), 482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229; PMCID: PMC6604941. DOI: [10.3934/microbiol.2018.3.482](https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482).
- RIEDLINGER, J.; REIKE, A.; ZA“HNER, H.; KRISMER, B.; BULL, A. T.; MALDONADO L. A.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; BISTER, B.; BISCHOFF, D.; FIEDLER, H. P. (2004). Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid. *J Antibiot*, 57, 271–279. DOI: [10.7164/antibiotics.57.271](https://doi.org/10.7164/antibiotics.57.271).
- ROES, L.; MEYER, P. (2005). *Streptomyces pharetrae* sp. nov. isolated from soil from the semiarid Karoo region. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28, 488–49. DOI: [10.1016/j.syapm.2005.03.006](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.03.006).
- RYU, M. J.; HWANG, S.; KIM, S.; YANG, I.; OH, D.; NAM, S.; FENICAL, W. (2019). Meroindenon and merochlorins E and F, antibacterial meroterpenoids from a marine-derived sediment bacterium of the Genus *Streptomyces*. *Org Lett*, 21, 5779–5783. DOI:10.1021/acs.orglett.9b01440 [PubMed: 31298867].
- SABIDO, E. M.; TENEBRO, C. P.; SUAREZ, A. F. L.; ONG, D. C.; TRONO, D. J.; AMAGO, D. S.; EVANGELISTA, J. E.; REYNOSO, A. M.; VILLALOBOS, I. G.; ALIT, L. D.; SURIGAO, C. F.; VILLANUEVA, C. A.; SALUDES, J. P. DALISAY, D. S. (2020).

Marine sediment-derived *Streptomyces* strain produces angucycline antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* harboring SCCmec type 1 gene. *J. Mar. Sci. Eng.*, 8, 734. <https://doi.org/10.3390/jmse8100734>.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. (2001). Molecular cloning-a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, J.; COY-BARRERA, E.; VILLAMIL, L.; DÍAZ, L. (2020). *Streptomyces*-derived metabolites with potential photoprotective properties—A systematic literature review and meta-analysis on the reported chemodiversity. *Molecules*, 25, 3221. DOI: [10.3390/molecules25143221](https://doi.org/10.3390/molecules25143221).

SATHISH, K. S.; KOKATI, V. B. (2012). *In-vitro* antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 2, 787–92. DOI: [10.1016/S2221-1691\(12\)60230-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60230-5).

SATHIYASEELAN, K.; STELLA, D. (2011). Isolation, identification and antimicrobial activity of marine actinomycetes isolated from Parangipettai. *Recent Res Sci Technol*, 3, 74 – 77. <https://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/779>.

SCHATZ, A.; WAKSMAN, S. A. (1944). Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Biol Med*, 57, 244 –248. <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-57-14769>.

SCHINKE, C.; MARTINS, T.; QUEIROZ, S. C. N.; MELO, I. S.; REYES, F. G. R. (2017). Antibacterial Compounds from Marine Bacteria, 2010–2015. *J. Nat. Prod.*, 80, 1215–1228. [CrossRef] [PubMed]. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00235>.

SCHMITT, S.; TSAI, P.; BELL, J.; FROMONT, J.; ILAN, M.; LINDQUIST, N.; PEREZ, T.; RODRIGO, A.; SCHUPP, P. J.; VACELET, J.; WEBSTER, N.; HENTSCHEL, U.; TAYLOR, M. W. (2012). Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 6, 564-576. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.116>.

SCHNEEMANN, I.; KAJAHN, I.; OHLENDORF, B.; ZINECKER, H.; ERHARD, A.; NAGEL, K.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. (2010). Mayamycin, a cytotoxic polyketide from a *Streptomyces* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J Nat Prod*, 73, 1309–1312. DOI:10.1021/np100135b [PubMed: 20545334].

SCHREMPF, H. (2001). Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79, 285-289. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1012058205158>.

SEIPKE, R. F.; BARKE, J.; RUIZ-GONZALEZ, M. X.; ORIVEL, J.; YU, D. W.; HUTCHINGS, M. I. (2012a). Fungus-growing *Allomerus* ants are associated with antibiotic-producing actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 443–447. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9621-y>.

SEIPKE, R. F.; KALTENPOTH, M.; HUTCHINGS, M. I. (2012b). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS Microbiol Rev*, 36 (4), 862-876. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x>.

SELIM, M. S. M.; ABDELHAMID, S. A.; MOHAMED, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnol*, 19, 72. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>.

- SELIM, M. S., ABDELHAMID, S. A., & MOHAMED, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>
- SELVAN P, RAVIKUMAR S, RAMU A, NEELAKANDAN P. (2012) Antagonistic activity of marine sponge associated *Streptomyces* sp. against isolated fish pathogens. *Asi Pac J Trop Dis*:724–728. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60252-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60252-7)
- SENGUPTA, S.; PRAMANIK, A.; GHOSH, A.; BHATTACHARYYA, M. (2015). Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiol.*, 15, 170. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0495-4>.
- SER, H. L.; PALANISAMY, U. D.; YIN, W. F.; ABD MALEK, S. N.; CHAN, K. G.; GOH, B. H.; LEE, L. H. (2015a). Presence of antioxidative agent, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Front. Microbiol.*, 6, 854. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00854>.
- SER, H. L.; PALANISAMY, U. D.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; GOH, B. H.; LEE, L. H. (2016a). *Streptomyces malaysiense* sp. nov.: A novel Malaysian mangrove soil actinobacterium with antioxidative activity and cytotoxic potential against human cancer cell lines. *Sci. Rep.*, 6, 24247. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep24247>.
- SER, H. L.; TAN, L. T.; PALANISAMY, U. D.; ABD MALEK, S. N.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; GOH, B. H.; LEE, L. H. (2016b). *Streptomyces antioxidans* sp. nov., a Novel Mangrove Soil Actinobacterium with Antioxidative and Neuroprotective Potentials. *Front. Microbiol.*, 7, 899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00899>.
- SER, H. L.; ZAINAL, N.; PALANISAMY, U. D.; GOH, B. H.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; LEE, L. H. (2015b). *Streptomyces gilvigriseus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from mangrove forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107, 1369–1378. DOI: [10.1007/s10482-015-0431-5](https://doi.org/10.1007/s10482-015-0431-5).
- SHAABAN, K.; SHAABAN, M.; FACEY, P.; FOTSO, S.; FRAUENDORF, H.; HELMKE, E.; MAIER, A.; FIEBIG, H. H.; LAATSCH, H. (2008). Electrospray Ionization Mass Spectra of Piperazimycins A and B and γ -Butyrolactones from a Marine-derived *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 61, 736–746. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2008.87>.
- SHARIFI, M.; BIPINRAJ, N. K. (2019). Isolation and Identification of Actinomycetes with Anticandida Activity from Mangrove Soil. *Biosci Biotech Res Asia*, 16(3). DOI: <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2776>.
- SHARMA, S.; FULKE, A. B.; CHAUBEY, A. (2019). Bioprospection of marine actinomycetes: recent advances, challenges and future perspectives. *Acta Oceanol. Sin.*, 38, 1–17 <https://doi.org/10.1007/s13131-018-1340-z>.
- SHARMA, T. K.; MAWLANKAR, R.; SONALKAR, V. V.; SHINDE, V. K.; ZHAN, J.; LI, W. J.; RELE, M. V.; DASTAGER, S. G.; KUMAR, L. S. (2016). *Streptomyces lonarensis* sp. nov., isolated from Lonar Lake, a meteorite salt water lake in India. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109, 225–235. DOI: [10.1007/s10482-015-0626-9](https://doi.org/10.1007/s10482-015-0626-9).
- SHI, S.; CUI, L.; ZHANG, K.; ZENG, Q.; LI, Q.; MA, L.; LONG, L.; TIAN, X. (2022). *Streptomyces marincola* sp. nov., a Novel Marine Actinomycete, and Its Biosynthetic

- Potential of Bioactive Natural Products. *Front. Microbiol.* 13:860308. DOI: 10.3389/fmicb.2022.860308.
- SHICHI, H.; TANOUCI, Y.; KAMADA, Y. (1989). Immunosuppressive agent. *Chem Abstr*, 112, 91 787g. US patent 4,843,092.
- SIDDHARTH, S.; VITTAL, R. R. (2019). Isolation, Characterization, and Structural Elucidation of 4-Methoxyacetanilide from Marine Actinobacteria *Streptomyces* sp. SCA29 and Evaluation of Its Enzyme Inhibitory, Antibacterial, and Cytotoxic Potential. *Arch. Microbiol.*, 201, 737–746. [CrossRef]. DOI: [10.1007/s00203-019-01634-y](https://doi.org/10.1007/s00203-019-01634-y).
- SILVA, F. S.; SOUZA, D. T.; ZUCCHI, T. D.; PANSA, C. C.; DE FIGUEIREDO VASCONCELLOS, R. L.; CREVELIN, E. J.; DE MORAES, L. A.; MELO, I. S. (2016). *Streptomyces atlanticus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from marine sponge *Aplysina fulva* (Pallas, 1766). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109, 1467–1474. DOI: [10.1007/s10482-016-0748-8](https://doi.org/10.1007/s10482-016-0748-8).
- SILVA, G. C.; KITANO, I. T.; RIBEIRO, I. A. F.; LACAVAL, P. T. (2022). The Potential Use of Actinomycetes as Microbial Inoculants and Biopesticides in Agriculture. *Front. Soil Sci.*, 2, 833181. DOI: 10.3389/fsoil.2022.833181.
- SINGH, V.; HAQUE, S.; SINGH, H.; VERMA, J.; VIBHA, K.; SINGH, R.; JAWED, A.; TRIPATHI, C. K. M. (2016). Isolation, Screening, and Identification of Novel Isolates of Actinomycetes from India for Antimicrobial Applications. *Front. Microbiol.*, 7, 1921. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01921>.
- SIRO, G.; PIPITE, A.; CHRISTI, K.; SRINIVASAN, S. AND SUBRAMANI, R. (2022). Marine Actinomycetes Associated with Stony Corals: A Potential Hotspot for Specialized Metabolites. *Microorganisms.*, 10(7), 1349. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10071349>.
- SIVA KUMAR, K. (2001). Actinomycetes of an Indian Mangrove (Pichavaram) environment: An Inventory. Ph.D. thesis, Annamalai University, India, 91.
- SKARIYACHAN, S.; ACHARYA, A. B.; SUBRAMANIYAN, S.; BABU, S.; KULKARNI, S.; NARAYANAPPA, R. (2016). Secondary metabolites extracted from marine sponge associated *Comamonas testosteroni* and *Citrobacter freundii* as potential antimicrobials against MDR pathogens and hypothetical leads for VP40 matrix protein of Ebola virus: An in vitro and in silico investigation. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 34, 1865–1883. DOI: [10.1080/07391102.2015.1094412](https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1094412).
- SLABY, B. M.; HACKL, T.; HORN, H.; BAYER, K.; HENTSCHEL, U. (2017). Metagenomic binning of a marine sponge microbiome reveals unity in defense but metabolic specialization. *ISME J.*, 11, 2465–2478. DOI: 10.1038/ismej.2017.101.
- SOLANKI, R.; KHANNA, M.; LAL, R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol.*, 48, 410–431. DOI: 10.1007/s12088-008-0052-z.
- SOUZA, D. T.; SILVA, F. S. P. D.; SILVA, L. J. D.; CREVELIN, E. J.; MORAES, L. A. B.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. (2017). *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the marine sponge *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67, 2019–2025. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijsem.0.001912](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001912).

SRINIVASAN, R.; KANNAPPAN, A.; SHI, C.; LIN, X. (2021). Marine Bacterial Secondary Metabolites: A Treasure House for Structurally Unique and Effective Antimicrobial Compounds. *Mar. Drugs*, 19, 530. <https://doi.org/10.3390/md19100530>.

STACH, J. E. M. AND BULL, A. T. (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 3–9. DOI: [10.1007/s10482-004-6524-1](https://doi.org/10.1007/s10482-004-6524-1).

STACH, J. E.; MALDONADO, L. A.; MASSON, D. G.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. (2003). Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6189–6200. DOI: [10.1128/AEM.69.10.6189-6200.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6189-6200.2003).

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. (2012). Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167, 571-580. DOI: [10.1016/j.micres.2012.06.005](https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.005).

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. (2013). Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 9291-9321. DOI: [10.1007/s00253-013-5229-7](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5229-7).

SUBRAMANI, R.; SIPKEMA, D. (2019). Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Mar Drugs*, 26, 17(5), 249. DOI: 10.3390/md17050249. PMID: 31035452; PMCID: PMC6562664.

SUJATHA, P.; BAPI RAJU, K. V.; RAMANA, T. (2005a). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*, 160, 119- 126. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.10.006>.

SUJATHA, P.; KURADA, V. B.; TERLI, R. (2005b). Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 583–585. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-004-3493-5>.

SUN, C.L.; YANG, Z. J.; ZHANG, C. Y.; LIU, Z. Y.; HE, J. Q.; LIU, Q.; ZHANG, T. Y.; MA, J. Y. (2019). Genome Mining of *Streptomyces atratus* SCSIO ZH16: Discovery of Atratumycin and Identification of Its Biosynthetic Gene Cluster. *Org Lett*, 21, 1453–1457. DOI:10.1021/acs.orglett.9b00208 [PubMed: 30746943].

SUN, W.; DAI, S.; JIANG, S.; WANG, G.; LIU, G.; WU, H.; LI, X. (2010). Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98, 65-75. DOI: [10.1007/s10482-010-9430-8](https://doi.org/10.1007/s10482-010-9430-8).

SUPONG, K.; SURIYACHADKUN, C.; PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUWANBORIRUX, K.; THAWAI, C. (2013a). *Micromonospora spongicola* sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. *J. Antibiot.*, 66, 505–509. [CrossRef]. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2013.35>.

SUPONG, K.; SURIYACHADKUN, C.; SUWANBORIRUX, K.; PITTAYAKHAJONWUT, P.; THAWAI, C. (2013b). *Verrucosispora andamanensis* sp. nov., isolated from a marine sponge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 3970–3974. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijs.0.050906-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.050906-0).

- SUPONG, K.; THAWAI, C.; SUWANBORIRUX, K.; CHOOWONG, W.; SUPOTHINA, S.; PITTAYAKHAJONWUT, P. (2012). Antimalarial and antitubercular C-glycosylated benz[a]anthraquinones from the marine-derived *Streptomyces* sp. BCC45596. *Phytochem Lett*, 5, 651–656. DOI:10.1016/j.phytol.2012.06.015.
- SUTHINDHIRAN, K.; JAYASRI, M. A.; DIPALI, D.; PRASAR, A. (2014). Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern. *Journal of Basic Microbiology*, 54, 1098-1109. DOI: [10.1002/jobm.201300563](https://doi.org/10.1002/jobm.201300563).
- TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S.; MENDELSON, M.; MONNET, D. L.; PULGINI, C.; KAHLMETER, G.; *et al.* (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.*, 18, 318–327. [CrossRef]. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- TAKAHASHI, Y.; NAKASHIMA, T. (2018). Actinomycetes, an Inexhaustible Source of Naturally Occurring Antibiotics. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(2), 45. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020045>.
- TAMEHIRO, N.; HOSAKA, T.; XU, J.; HU, H.; OTAKE, N.; OCHI, K. (2003). Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6412–6417. DOI: [10.1128/AEM.69.11.6412-6417.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6412-6417.2003).
- TAMELANDER, T.; SPILLING, K.; WINDER, M. (2017). Organic matter export to the seafloor in the Baltic Sea: Drivers of change and future projections. *Ambio*, 46, 842–851. DOI: [10.1007/s13280-017-0930-x](https://doi.org/10.1007/s13280-017-0930-x)
- TAN, L. T. H.; LEE, L. H.; GOH, B. H. (2019). The bioprospecting of anti-*Vibrio Streptomyces* species: prevalence and applications. *Prog Microbes Mol Biol*, 2(1), a0000034. DOI: <https://doi.org/10.36877/pmmb.a0000034>.
- TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. (2007). Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 71, 295–347. DOI: [10.1128/MMBR.00040-06](https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06).
- TENEBRO, C.P.; TRONO, D. J. V. L.; VICERA, C. V. B.; *et al.* (2021). Multiple strain analysis of *Streptomyces* species from Philippine marine sediments reveals intraspecies heterogeneity in antibiotic activities. *Sci Rep*, 11, 17544. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96886-4>.
- TERAHARA, T.; NAEMURA, T.; NAMPO, Y.; KOBAYASHI, T.; IMADA, C.; HAMADA, M.; TAMURA, T. (2019). *Streptomyces otsuchiensis* sp. nov., a biosurfactant-producing actinobacterium isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 69, 3740–3744. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003638>.
- TERRENI, M.; TACCANI, M.; PREGNOLATO, M. (2021). New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules.*, 2, 26(9), 2671. DOI: 10.3390/molecules26092671. PMID: 34063264; PMCID: PMC8125338.
- THAWAI, C.; RUNGJINDAMAI, N.; KLANBUT, K.; TANASUPAWAT, S. (2017). *Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67, 1451–1456. DOI: [10.1099/ijsem.0.001736](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001736).

- THOMAS, T. R. A.; KAVLEKAR, D. P.; LOKABHARATHI, P.A. (2010). Marine drugs from sponge-microbe association—A review. *Mar. Drugs.*, 8, 1417–1468. DOI: [10.3390/md8041417](https://doi.org/10.3390/md8041417).
- THONGPHROM, C.; KIM, J. H.; BORA, N.; KIM, W. (2017). *Tessaracoccus arenae* sp. nov., isolated from sea sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67, 2008–2013. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijsem.0.001907](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001907).
- THORNBURG, C. C.; MARK ZABRISKIE, T.; MCPHAIL, K.L. (2010). Deep-sea hydrothermal vents: potential hot spots for natural products discovery. *J. Nat. Prod.*, 73, 489–99. <https://doi.org/10.1021/np900662k>.
- TINDALL, B. J.; KAMPFER, P.; EUZEBY, J. P.; OREN, A. (2006). Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 2715–2720. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.64780-0>.
- TIWARI, K.; GUPTA, R. K. (2013). Diversity and isolation of rare actinomycetes: An overview. *Crit. Rev. Microbiol.*, 39, 256–294. DOI: [10.3109/1040841X.2012.709819](https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.709819).
- TORRES-BELTRÁN, M.; CARDOSO-MARTÍNEZ, F.; MILLÁN-AGUIÑAGA, N.; BECERRIL-ESPINOSA, A.; SORIA-MERCADO, I. E. (2012). Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas. *Cienc. Mar*, 38, 4. Ensenada dic. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v38i4.2131>.
- TULLY, B. J.; GRAHAM, E. D.; HEIDELBERG, J. F. (2018). The reconstruction of 2,631 draft metagenome-assembled genomes from the global oceans. *Sci. Data*, 5, 170203. DOI: <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.203>.
- UNDABARRENA, A.; BELTRAMETTI, F.; CLAVERÍAS, F. P.; GONZÁLEZ, M.; MOORE, E. R. B.; SEEGER, M.; CÁMARA, B. (2016). Exploring the Diversity and Antimicrobial Potential of Marine Actinobacteria from the Comau Fjord in Northern Patagonia, Chile. *Front Microbiol*, 7, 1- 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01135>.
- VALLIAPPAN, K.; SUN, W.; LI, Z. (2014). Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 7365–7377. [CrossRef]. DOI: [10.1007/s00253-014-5954-6](https://doi.org/10.1007/s00253-014-5954-6).
- VAN DISSEL, D.; CLAESSEN, D.; VAN WEZEL, G. P. (2014). Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Adv Appl Microbiol*, 89, 1–45. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9>.
- VAN SOEST, R. W. M.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; ERPENBECK, D.; DE VOOGD, N. J.; SANTODOMINGO, N.; VANHOORNE, B.; KELLY, M.; HOOPER, J. N. A. (2012). Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLOS ONE*, 7, e35105. DOI: [10.1371/journal.pone.0035105](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035105).
- VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; *et al.* (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66–74. DOI: [10.1126/science.1093857](https://doi.org/10.1126/science.1093857).
- VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 495-548. DOI: [10.1128/MMBR.00005-07](https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07).

- VEYISOGLU, A.; CARRO, L.; CETIN, D.; GUVEN, K.; SPRÖER, C.; PÖTTER, G.; KLENK, H. P.; SAHIN, N.; GOODFELLOW, M. (2016a). *Micromonospora profund* sp. nov., isolated from deep marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 4735–4743. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijsem.0.001419](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001419).
- VEYISOGLU, A.; CARRO, L.; GUVEN, K.; CETIN, D.; SPRÖER, C.; SCHUMANN, P.; KLENK, H. P.; GOODFELLOW, M.; SAHIN, N. (2016b). *Micromonospora yasonensis* sp. nov., isolated from a black sea sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109, 1019–1028. [CrossRef]. DOI: [10.1007/s10482-016-0701-x](https://doi.org/10.1007/s10482-016-0701-x).
- VEYISOGLU, A.; CETIN, D.; INAN BEKTAS, K.; GUVEN, K.; SAHIN, N. (2016c). *Streptomyces ovatisporus* sp. nov., isolated from deep marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 4856–4863. DOI: [10.1099/ijsem.0.001442](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001442).
- VEYISOGLU, A.; SAZAK, A.; CETIN, D.; GUVEN, K.; SAHIN, N. (2013). *Saccharomonospora amisosensis* sp. nov., isolated from deep marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 3782–3786. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijs.0.051516-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.051516-0).
- VIKRANT, P.; RAJEEV, M.; RAHUL, M. S.; MONALISA, M.; MEERA, S. M.; NEELAM, K.; PRASHANT, K. D.; PRABHKAR, K. R.; BIPINRAJ, N. K. (2015). Inhibition of pathogenic stains of *Candida albicans* and non albicans by *Bacillus* species isolated from traditional Indian fermented food preparation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 691-699. <https://www.researchgate.net/publication/273460476>.
- VOSER, T. M.; CAMPPELL, M. D.; CARROLL, A. R. (2022). How different are rare marine microbial natural products compared to their terrestrial counterparts. *Nat. Prod. Rep.*, 39, 7–19. DOI: [10.1039/D1NP00051A](https://doi.org/10.1039/D1NP00051A).
- WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes. *Proc Soc Exp Biol Med*, 45, 609. <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-45-11768>.
- WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. (1942). Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. *J Bacteriol*, 44, 373–384. DOI: [10.1128/jb.44.3.373-384.1942](https://doi.org/10.1128/jb.44.3.373-384.1942).
- WANG, C.; LU, Y.; CAO, S. (2020). Antimicrobial compounds from marine actinomycetes. *Arch Pharm Res.*, 43(7), 677-704. DOI: 10.1007/s12272-020-01251-0. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32691395; PMCID: PMC7703873.
- WANG, Q.; ZHANG, Y. X.; WANG, M.; TAN, Y.; HU, X. X.; HE, H. W.; XIAO, C. L.; YOU, X. F.; WANG, Y. G.; GAN, M. L. (2017). Neo-actinomycins A and B, natural actinomycins bearing the 5 H-oxazolo [4, 5-b] phenoxazine chromophore, from the marine-derived *Streptomyces* sp. IMB094. *SCI REP-UK*, 7,1–8. DOI:10.1038/s41598-01703769-8.
- WANG, S.; XU, X.; WANG, L.; JIAO, K.; ZHANG, G. (2015). *Georgenia subflava* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 4146–4150. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijsem.0.000553](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000553).
- WANG, S.; ZHOU, Y.; ZHANG, G. (2016). *Nocardioides flavus* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 5275–5280. DOI: [10.1099/ijsem.0.001507](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001507).

- WANNER, L.A. (2006). A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopathology*, 96, 1363–1371. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-96-1363>.
- WARD, A. C.; BORA, N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.04.004>.
- WEBSTER, N. S.; TAYLOR, M. W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental Microbiology*, 14, 335–346. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x).
- WEBSTER, N. S.; WILSON, K. J.; BLACKALL, L. L.; HILL, R. T. (2001). Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol.*, 67, 434–444. DOI: [10.1128/AEM.67.1.434-444.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.434-444.2001).
- WEI, X.; JIANG, Y.; CHEN, X.; JIANG, Y.; LAI, H. (2015). *Amycolatopsis flava* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from dead sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108, 879–885. [CrossRef]. DOI: [10.1007/s10482-015-0542-z](https://doi.org/10.1007/s10482-015-0542-z).
- WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protocols.*, 3(2), 163–75. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL, 2452–2492. In Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.G. (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed, vol 4. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- WILLIAMS, S. T.; VICKERS, J. C. (1988). Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives, 165–270. In Okami Y, Beppu T, Ogawara H (ed), *Biology of actinomycetes*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Fact Sheet 194, Updated November 2017. Available online:<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> (accessed on 17 January 2018).
- WRIGHT, G. D. (2012). Antibiotics: A new hope. *Chem. Biol.*, 19, 3–10. [CrossRef]. DOI: [10.1016/j.chembiol.2011.10.019](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.10.019).
- XIA, H.; ZHAN, X.; MAO, X. M.; LI, Y. Q. (2020). The regulatory cascades of antibiotic production in *Streptomyces*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 13. DOI: [10.1007/s11274-019-2789-4](https://doi.org/10.1007/s11274-019-2789-4).
- XIAO, J.; LUO, Y.; XIE, S.; XU, J. (2011). *Serinicoccus profundus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from deep-sea sediment and emended description of the genus *Serinicoccus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 16–199. DOI: [10.1099/ijs.0.019976-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.019976-0).
- XIONG, Z. Q.; LIU, Q. X.; PAN, Z. L.; ZHAO, N.; FENG, Z. X.; WANG, Y. (2015). Diversity and bioprospecting of culturable actinomycetes from marine sediment of the Yellow Sea, China. *Archives of Microbiology*, 197, 299–309. DOI: [10.1007/s00203-014-1059-y](https://doi.org/10.1007/s00203-014-1059-y).
- XU, B.; HU, B.; WANG, J.; LAN, Y.; ZHU, Y.; DAI, X.; HUANG, L.; HUANG, Y.; DU, W. (2018). *Virgibacillus indicus* sp. nov. and *Virgibacillus profundus* sp. nov, two moderately halophilic bacteria isolated from marine sediment by using microfluidic streak plates. *Int*

J Syst Evol Microbiol., 68(6), 2015-2023. DOI: 10.1099/ijsem.0.002782. Epub Apr 24. PMID: 29688169.

YAN, L.; WANG, J.; CHEN, Z.; GUAN, Y.; LI, J. (2015). *Microbacterium nanhaiense* sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 3697–3702. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijsem.0.000480](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000480).

YANG, C. F.; QIAN, R.; XU, Y.; YI, J. X.; GU, Y. W.; LIU, X. Y.; YU, H. B.; JIAO, B.H.; LU, X. L.; ZHANG, W. (2019). Marine actinomycetes-derived natural products. *Curr. Top. Med. Chem.*, 19, 2868–2918. DOI: 10.2174/1568026619666191114102359.

YANG, C. L.; WANG, Y. S.; LIU, C. L.; ZENG, Y. J.; CHENG, P.; JIAO, R. H.; BAO, S. X.; HUANG, H. Q.; TAN, R. X.; GE, H. M. (2017). Strepchazolins A and B: two new alkaloids from a marine *Streptomyces chartreusis* NA02069. *Mar Drugs*, 15, 244 DOI:10.3390/md15080244.

YANG, N.; SONG, F. (2018). Bioprospecting of Novel and Bioactive Compounds from Marine Actinomycetes Isolated from South China Sea Sediments. *Curr Microbiol*, 75, 142–149. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1358-z>.

YI, W. W.; LI, Q.; SONG, T. F.; CHEN, L.; LI, X. C.; ZHANG, Z. Z.; LIAN, X. Y. (2019). Isolation, structure elucidation, and antibacterial evaluation of the metabolites produced by the marine-sourced *Streptomyces* sp. ZZ820. *Tetrahedron*, 75, 1186–1193. DOI:10.1016/j.tet.2019.01.025.

YOU, Z. Q.; LI, J.; QIN, S.; TIAN, X. P.; WANG, F. Z.; ZHANG, S. (2013). *Georgenia sediminis* sp. nov., a moderately thermophilic actinobacterium isolated from sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 4243–4247. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.051714-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.051714-0).

YOUSIF, G.; BUSARAKAM, K.; KIM, B.Y.; GOODFELLOW, M. (2015). *Streptomyces mangrovi* sp. nov., isolated from mangrove forest sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108, 783–791. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0533-0>.

ZAINAL, N.; SER, H. L.; YIN, W. F.; TEE, K. K.; LEE, L. H.; CHAN, K. G. (2016). *Streptomyces humi* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil of a mangrove forest. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109, 467–474. DOI: [10.1007/s10482-016-0653-1](https://doi.org/10.1007/s10482-016-0653-1).

ZAITLIN, B.; WATSON, S,B, (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets, and truths. *Water Res.*, 40, 1741-1753. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.024>.

ZHANG, B.; TANG, S.; CHEN, X.; ZHANG, G.; ZHANG, W.; CHEN, T.; LIU, G.; LI, S.; DOS SANTOS, L. T.; CASTRO, H. C.; *et al.* (2018). *Streptomyces qaidamensis* sp. nov., isolated from sand in the Qaidam Basin, China. *J. Antibiot.*, 71, 880–886. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0080-9>.

ZHANG, D. F.; CHEN, W.; HE, J.; ZHANG, X.M.; XIONG, Z. J.; SAHU, M. K.; SIVAKUMAR, K.; LI, W. J. (2013a). *Saccharomonospora oceani* sp. nov. isolated from marine sediments in Little Andaman, India. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103, 1377–1384. [CrossRef]. DOI: [10.1007/s10482-013-9918-0](https://doi.org/10.1007/s10482-013-9918-0).

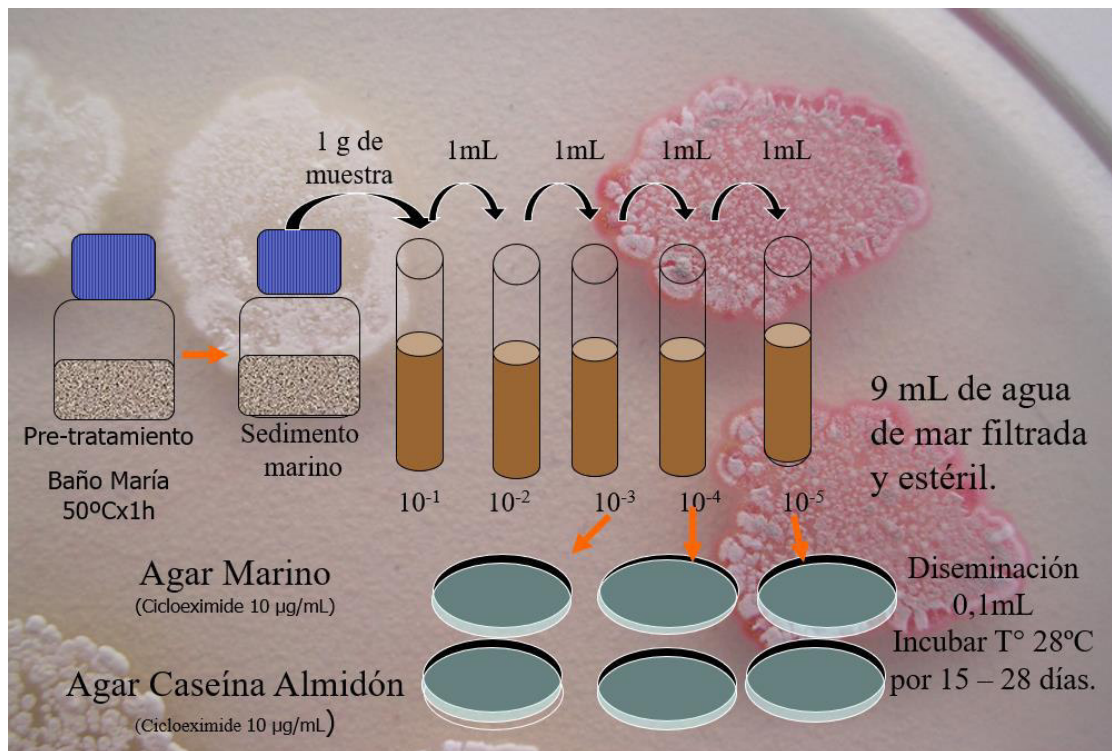
ZHANG, D. F.; JIANG, Z.; LI, L.; LIU, B. B.; ZHANG, X. M.; TIAN, X. P.; ZHANG, S.; LI, W. J. (2014a). *Pseudonocardia sediminis* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 745–750. [CrossRef]. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057844-0>.

- ZHANG, D. F.; JIANG, Z.; ZHANG, X. M.; YANG, L. L.; TIAN, X. P.; LONG, L. J.; ZHANG, S.; LI, W. J. (2014b). *Actinophytocola sediminis* sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2834–2840. [CrossRef]. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062638-0>.
- ZHANG, D. F.; PAN, H. Q.; HE, J.; ZHANG, X. M.; ZHANG, Y. G.; KLENK, H. P.; HU, J. C.; LI, W. J. (2013b). Description of *Streptomonospora sediminis* sp. nov. and *Streptomonospora nanhaiensis* sp. nov., and reclassification of *Nocardiosis arabis* Hozzein & Goodfellow 2008 as *Streptomonospora arabica* comb. nov. and emended description of the genus *Streptomonospora*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 4447–4455. DOI: [10.1099/ijs.0.052704-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.052704-0).
- ZHANG, D. F.; WANG, H. F.; XIONG, Z. J.; TIAN, X. P.; LIU, L.; ZHANG, X. M.; JIANG, Z.; ZHANG, S.; LI, W. J. (2014c). *Mariniluteicoccus flavus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Propionibacteriaceae, isolated from a deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 1051–1056. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.058404-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.058404-0).
- ZHANG, D. F.; ZHONG, J. M.; ZHANG, X. M.; JIANG, Z.; ZHOU, E. M.; TIAN, X. P.; ZHANG, S.; LI, W. J. (2014d). *Nocardioides nanhaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from a marine sediment sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2718–2722. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.062851-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.062851-0).
- ZHANG, D.; SHU, C. Y.; LIAN, X. Y.; ZHANG, Z. Z. (2018). New antibacterial bagremycins F and G from the marine-derived *Streptomyces* sp. ZZ745. *Mar Drugs*, 16, 330. DOI:10.3390/md16090330.
- ZHANG, D.; YI, W. W.; GE, H. J.; ZHANG, Z. Z., WU, B. (2019). Bioactive Streptoglutarimides A–J from the Marine-Derived *Streptomyces* sp. ZZ741. *J Nat Prod*, 82, 2800–2808. DOI:10.1021/acs.jnatprod.9b00481 [PubMed: 31584271].
- ZHANG, G.; REN, H.; WANG, S.; CHEN, X.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, Y. (2014). *Janibacter indicus* sp. nov., isolated from hydrothermal sediment of the Indian Ocean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2353–2357. [CrossRef].
- ZHANG, G.; WANG, L.; LI, J.; ZHOU, Y. (2016a). *Amycolatopsis albisporea* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 3860–3864. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijsem.0.001277](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001277).
- ZHANG, G.; WANG, L.; LI, J.; ZHOU, Y. (2017). *Pseudonocardia profundimaris* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67, 1693–1697. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijsem.0.001849](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001849).
- ZHANG, G.; WANG, S.; WANG, L. (2016b). *Sediminivirga luteola* gen. nov., sp. nov., a member of the family Brevibacteriaceae, isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 1494–1498. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijsem.0.000909](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000909).
- ZHANG, G.; ZHANG, Y.; YIN, X.; WANG, S. (2015). *Nesterenkonia alkaliphila* sp. nov., an alkaliphilic, halotolerant actinobacteria isolated from the western Pacific Ocean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 516–521. [CrossRef]. DOI: [10.1099/ijs.0.065623-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.065623-0).
- ZHANG, H. T.; LEE, Y. K.; ZHANG, W.; LEE, H. K. (2006). Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: Isolation and phylogenetic diversity by RNAr 16SGene-RFLP analysis. *Anton Leeuwenhoek.*, 90, 159–169. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9070-1>.

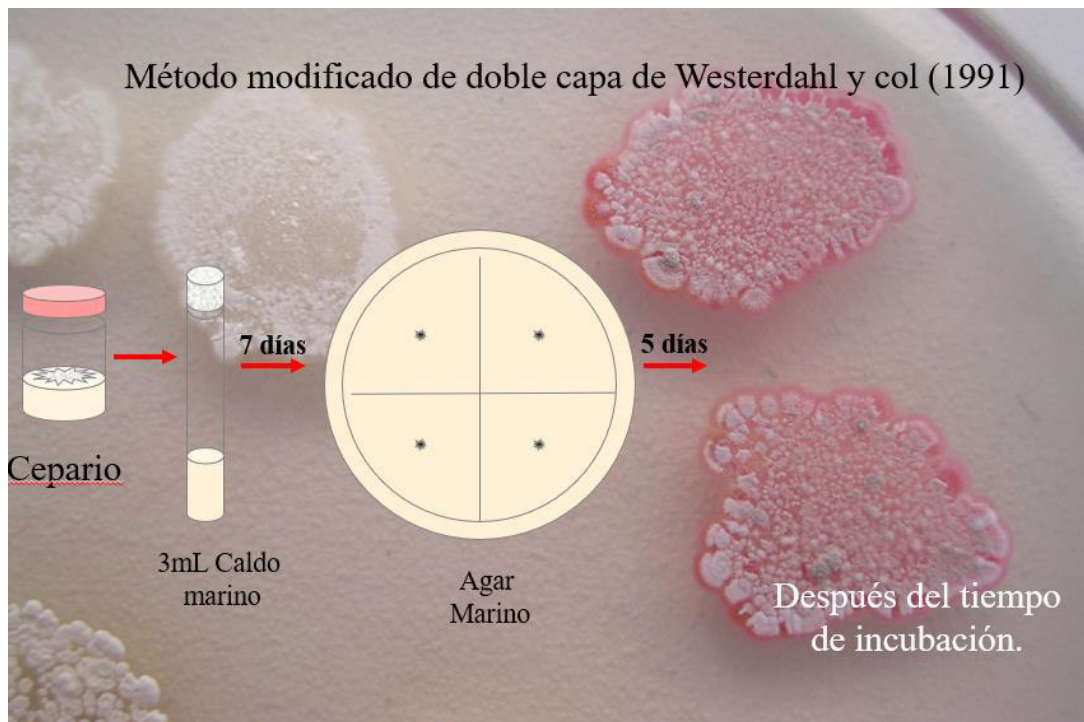
- ZHANG, H. T.; ZHANG, W.; JIN, Y.; JIN, M; YU, X. (2008). A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Anton. Leeuwenhoek*, 93, 241–248. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9196-9>.
- ZHANG, S. W.; GUI, C.; SHAO, M. W.; KUMAR, P. S.; HUANG, H. B.; JU, J. H. (2018). Antimicrobial tunicamycin derivatives from the deep sea-derived *Streptomyces xinghaiensis* SCSIO S15077. *Nat Prod Res*, 1–6. DOI: 10.1080/14786419.2018.1493736.
- ZHANG, S.; GUI, C.; SHAO, M.; KUMAR, P.S.; HUANG, H.; JU, J. (2018). Antimicrobial tunicamycin derivatives from the deep sea-derived *Streptomyces xinghaiensis* SCSIO S15077. *Nat. Prod. Res.*, 34, 1499–1504. DOI: [10.1080/14786419.2018.1493736](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493736).
- ZHANG, Y.; REN, H.; ZHANG, G. (2014). *Microbacterium hydrothermale* sp. nov., an actinobacterium isolated from hydrothermal sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 3508–3512. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/ijs.0.061697-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.061697-0).
- ZHAO, C.; ZHU, T.; ZHU, W. (2013). New marine natural products of microbial origin from 2010 to 2013. *Chinese J Org Chem*, 33, 1195–1234. DOI: http://sioc-journal.cn/Jwk_yjhx/CN/10.6023/cjoc201304039.
- ZHOU, B.; HUANG, Y.; ZHANG, H. J.; LI, J. Q.; DING, W. J. (2019). Nitricquinomycins A-C, uncommon naphthopyrrolediones from the *Streptomyces* sp. ZS-A45. *Tetrahedron*, 75, 3958–3961. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.05.060>.
- ZHU, H.; SWIERSTRA, J.; WU, C.; GIRARD, G.; CHOI, Y. H.; VAN WAMEL, W.; SANDIFORD, S. K.; VAN WEZEL, G. P. Y. (2014). Eliciting antibiotics active against the ESKAPE pathogens in a collection of actinomycetes isolated from mountain soils. *Microbiology*, 160, 1714–1725. [CrossRef] [PubMed]. DOI: [10.1099/mic.0.078295-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.078295-0).
- ZIEMERT, N.; LECHNER, A.; WIETZ, M.; MILLAN-AGUINAGA, N.; CHAVARRIA, K. L.; JENSEN, P. R. (2014). Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111, E1130–E1139. DOI: 10.1073/pnas.1324161111.

X. ANEXO

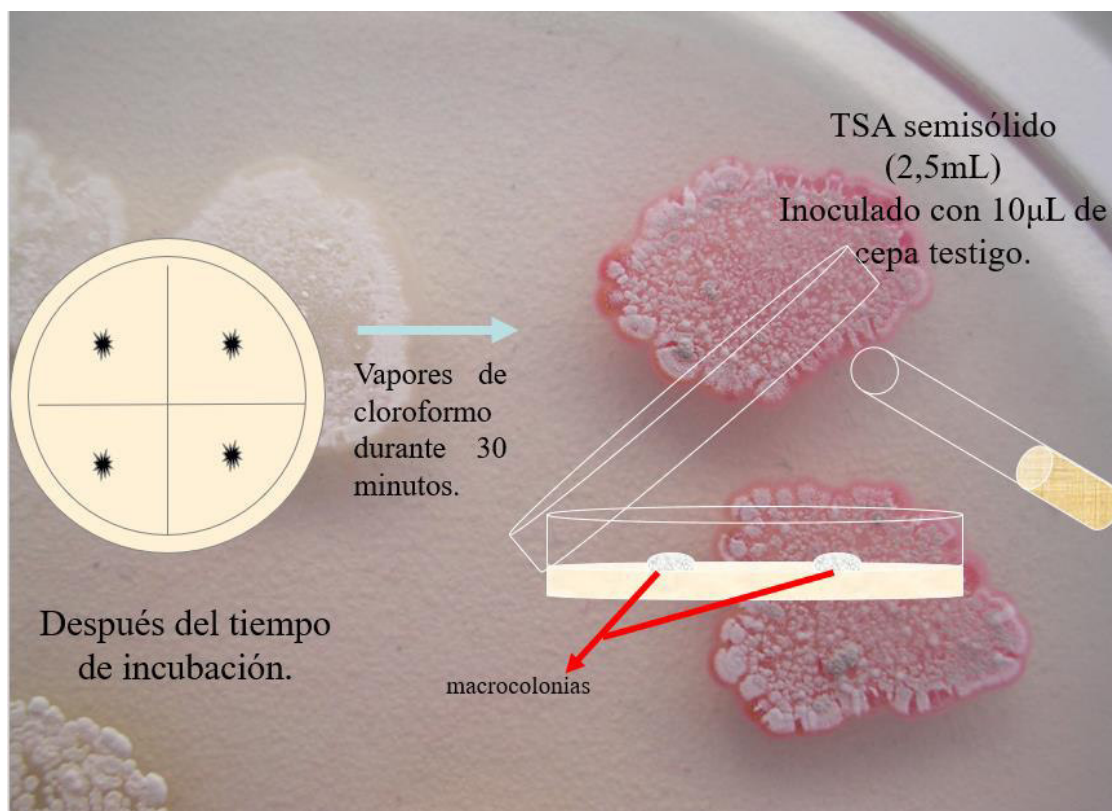
Anexo 1. Procesamiento de muestras de sedimento marino para el aislamiento de actinomicetos (elaboración propia).



Anexo 2. Cultivo de actinomicetos previa a la prueba de la actividad antimicrobiana.



Anexo 3. Tratamiento de actinomicetos con vapores de cloroformo previo a las pruebas de actividad antimicrobiana (elaboración propia).



Anexo 4. Evaporador rotatorio utilizado en la obtención de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana a partir de extractos crudos obtenidos con solventes orgánicos

