



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DEPARTAMENTO ACADEMICO
DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
ACTINOMICETOS HALÓFILOS DE LAS SALINAS DE MÓRROPE FRENTE A
Staphylococcus aureus METICILINO-RESISTENTE Y ***Escherichia coli***
PRODUCTOR DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGIA – MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

PRESENTADO POR:

Br. RENE FLORES CLAVO.

Br. ENMANUEL EDINSON PISFIL CUSTODIO.

LAMBAYEQUE – PERU

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADEMICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

Aislamiento, caracterización y actividad antibacteriana de actinomicetos halófilos de las Salinas de Mórrope frente a *staphylococcus aureus* meticilino-resistente y *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).



TESIS

Para optar el Título Profesional de:

LICENCIADO EN BIOLOGIA – MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

PRESENTADO POR:

Br. Rene Flores Clavo.

Br. Enmanuel Edinson Pisfil Custodio.

LAMBAYEQUE - PERÚ

2014

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
ACTINOMICETOS HALÓFILOS DE LAS SALINAS DE MÓRROPE FRENTE A
Staphylococcus aureus METICILINO-RESISTENTE Y *Escherichia coli* PRODUCTOR
DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).

TESIS

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGIA – MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA**

PRESENTADO POR:

Br. Rene Flores Clavo.

Br. Enmanuel Edinson Pisfil Custodio.

APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

Dra. MARTHA VERGARA ESPINOZA _____
Presidenta

Dr. CARLOS VILLANUEVA AGUILAR _____
Secretario

Lic. JORGE CHANAME CESPEDES _____
Vocal

Dra. OLGA FRANCIA ARANA _____
Patrocinadora

“Con esperanza, esfuerzo y dedicación logras alcanzar tus metas, pero con la ayuda de Dios y el apoyo de tus padres vences todos los obstáculos que se presentan en el camino y al final del trayecto merecer todo lo que te hayas propuesto y hasta donde quieras llegar”

Dedicatoria

A Dios, porque siempre en cada
Momento me eh visto protegida
O ha iluminado mi camino, en las tormentas
Remó conmigo y cuando creía que todo hiva mal él
Fue mi amigo y compañero en todo este periodo de aprendizaje.

A mis padres: Josué y Adelinda, por
Haber hecho de mí la mujer que soy
Con sus múltiples enseñanzas y
Consejos, pero con su grande amor
Llenaron mi vida de paz y felicidad

A mi hermana mayor Sonia que estuvo
Connigo en todo momento, a ella le debo
Lo que soy, todos mis logros llevaran
Como título tu nombre este logro fue
Por todas las veces en la que me tendiste la mano
Para salir adelante siempre, nunca me dejaste sola
A mis tres hermanos Pablo, Fany, Wilmer
Que ustedes serán mi inspiración en todo lo que
Aún queda por aprender.

.

Y a mis queridos amigos de toda
la vida Gy, Ledy, Eduar, Oscar
Yuliana, Deyssi, esto también
lleva su nombre porque siempre
Han estado ahí conmigo en todo momento.

Rene Flores Plaro

Dedicatoria

A mis padres, Santos y Bertha
Por haber sembrado el anhelo de superación
En todo momento de mi vida, por su apoyo
Su sacrificio y comprensión.

A todas las personas y principalmente
A la Doctora Martha Vergara Espinoza y
M.V. Zully Montenegro Esquivel que me
Apoyaron para fortalecerme como profesional.

Finalmente a Patricia y Sami.

Enmanuel E. Disfil Custodio

Agradecimiento

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento:

A Dios que es quien nos dio
Fortaleza y sabiduría para llegar a cumplir
Con la meta final del presente estudio e hizo
Realidad este sueño anhelado.

A la Doctora Fabiana Fantinatti Garboggini
Quien fue partícipe directa en la elección de
La línea de investigación, posteriormente a
La Dra. Olga Francia Arana por orientarnos
En el proceso y desarrollo de la presente tesis.

Asimismo nuestro agradecimiento a
Los Doctores, Verónica Lluntop Chávez,
Víctor Hugo Díaz Silva y Nancy Mocarro Aguilar
Por permitirnos trabajar en los ambientes del área
De Investigación del Hospital Regional Lambayeque.

Extensivo nuestro agradecimiento a los Biólogos
Zhandra Arce Gil y José Llontop Núñez, docentes
Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo,
Por su apoyo en la aplicación de técnicas moleculares.

Rene Flores Clavo - Emmanuel E. Pífil Custodio

CONTENIDO

CONTENIDO	1
INDICE DE TABLAS	3
INDICE DE FIGURAS	4
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	14
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO.....	16
3.3. MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
3.4. MÉTODOS.....	16
3.4.1. Zona de muestreo	16
3.4.2. Toma de muestra	19
3.4.3. Enriquecimiento de los actinomicetos	19
3.4.4. Aislamiento de los actinomicetos	19
3.4.5. Determinación del crecimiento de actinomicetos en medio líquido	20
3.4.6. Prueba de tolerancia salina de actinomicetos	20
3.4.7. Identificación de los actinomicetos	20
3.4.8. Estandarización de cepas indicadoras	21
3.4.9. Determinación de la actividad antibacteriana	21
3.4.10. Análisis estadístico de los datos.....	22
IV. RESULTADOS	23
4.1. Caracterización de las muestras de dos zonas de muestreo en las salinas de Mórrope.....	23
4.2. Caracterización del crecimiento de los actinomicetos halófilos en medio sólido.....	25

4.3. Caracterización del crecimiento de los actinomicetos halófilos en medio líquido salino.....	26
4.4. Tolerancia de los actinomicetos a diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio	28
4.5. Identificación de los actinomicetos aislados de las salinas de Mórrope.....	29
4.6. Actividad antibacteriana de actinomicetos halófilos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	33
4.7. Actividad antibacteriana de actinomicetos frente a <i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido	36
4.8. Categorización de los actinomicetos con actividad inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente y <i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasa de espectro extendido	39
4.9. Distribución de los actinomicetos con actividad inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente y <i>Escherichia coli</i> BLEE en las dos zonas de muestreo	40
V. DISCUSIÓN.....	42
VI. CONCLUSIONES.....	42
VII. RECOMENDACIONES.....	48
VIII. RESUMEN.....	49
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50
X. ANEXOS.....	55

INDICE DE TABLAS

N°	Págs.
Tabla 1. Número de muestras obtenidas según la zona de muestreo (A y B), profundidad y georeferencia en las Salinas de Mórrope.	17
Tabla 2. Caracterización de 14 muestras de agua y sedimento de las zonas de muestreo A y B de las Salinas de Mórrope.	24
Tabla 3. Halos de actividad inhibitoria en mm de 26 cepas de actinomicetos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> metililino resistente.	34
Tabla 4. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición de actinomicetos halófilos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> metililino resistente.	34
Tabla 5. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de inhibición de los actinomicetos halófilos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> metililino resistente.	35
Tabla 6. Halos de actividad inhibitoria en mm de 27 cepas de actinomicetos halófilos frente a <i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido.	37
Tabla 7. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición del crecimiento de actinomicetos frente a <i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido.	37
Tabla 8. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de inhibición del crecimiento de actinomicetos frente a <i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido.	38

INDICE DE FIGURAS

N°	Págs.
Figura 1. Ubicación geográfica de las Salinas de Mórrope en el departamento de Lambayeque.	15
Figura 2. Caracterización de las Salinas de Mórrope – Lambayeque.	16
Figura. 3. Toma de muestra de agua y sedimento salino a nivel de superficie (A) y profundidad (B) en las Salinas de Mórrope.	17
Figura 4. Georeferencia de la zona A con sus 7 puntos de muestreo.	18
Figura 5. Georeferencia de la zona B con sus 7 puntos de muestreo.	18
Figura 6. Número de cepas de actinomicetos según color y forma de las colonias en agar marino modificado.	25
Figura 7. Características del crecimiento de actinomicetos en caldo salino de cuatro cepas A, B, C y D.	27
Figura 8. Número de cepas de actinomicetos según las características de crecimiento (A, B, C, D, E y F).	28
Figura 9. Número de cepas de actinomicetos que crecieron en rangos salinos desde 0 - 15% y desde 3 - 15%.	29
Figura 10. Caracterización de colonias y filamentos vegetativos y reproductores de cuatro cepas de actinomicetos, Morsa 01-04, Morsa 03-06, morsa 07-02 y morsa 08-04 que pertenecen al género <i>Streptomyces</i> .	30
Figura 11. Caracterización de colonias y filamentos vegetativos y reproductores de cuatro cepas de actinomicetos, Morsa 01-03, Morsa 01-05, morsa 08-02 y morsa 14-02 que pertenecen al género <i>Nocardia</i> .	31
Figura 12. Caracterización de colonias y filamentos vegetativos y reproductores de cuatro cepas de actinomicetos, Morsa 03-03, Morsa 10-01, morsa 12-04 y morsa 13-04 que pertenecen a otros géneros no identificados.	32

Figura 13. Halos de actividad de las cepas de actinomicetos Morsa 05-01 y Morsa 04-03 con tres repeticiones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente.	33
Figura. 14. Halos de inhibición del crecimiento de la cepa de actinomiceto Morsa 05-01 con tres repeticiones frente a <i>E. coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido.	36
Figura 15. Caracterización de los actinomicetos con respecto a su actividad frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente y <i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido.	39
Figura. 16. Número de cepas de actinomicetos con actividad inhibitoria distinta frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente, distribuidos en la zona A y zona B.	40
Figura 17. Número de cepas de actinomicetos con actividad inhibitoria distinta frente a <i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido distribuidos en la zona A y zona B.	41

I. INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza principalmente en la tierra, en agua dulce y en agua salada, su función principal es la descomposición de la materia orgánica; pertenecen al dominio Bacteria debido a que los análisis filogenéticos de la secuencia del gen del ARNr 16 S claramente muestran una línea filogenética bien diferenciada dentro de las bacterias Gram positivas de alto contenido de guanina más citosina (G+C). Su pared celular está compuesta por un alto contenido de peptidoglicano (N-acetilglucosamina, ácido murámico, alanina y ácido glutámico), mientras que el diámetro de sus filamentos es inferior al de los hongos ya que varía entre 0.5 hasta 1 μm . Morfológicamente adoptan diferentes formas desde bacilos y cocos relativamente simples a organizaciones miceliales altamente complejas (**Carrillo, 2003**).

En las salinas costeras la evaporación del agua permite la concentración de las sales, manteniendo proporciones relativas muy similares a las que se presentan en el mar; además están expuestas a irradiación solar u oscilaciones de temperatura entre el día y la noche y poseen un bajo contenido de oxígeno, ya que su solubilidad en estos hábitats es mínima, es así que bajo estas condiciones extremas las bacterias realizan procesos metabólicos en altas concentraciones de sales y pH alcalino produciendo una serie de metabolitos secundarios química y biológicamente importantes para el desarrollo y producción de nuevos compuestos de importancia en la industria farmacológica.

Los actinomicetos halófilos han sido estudiados en diferentes países como India, Turquía, Corea, México, Chile, etc., en donde se han realizado muestreos en ambientes salinos extremos de distintas zonas geográficas como suelos salados, lagunas saladas y salinas costeras, cuyas investigaciones han tenido como objetivo aislar, caracterizar y determinar la actividad antimicrobiana, demostrando estos microorganismos son productores de nuevos metabolitos y

pueden ser la alternativa que reemplace a los fármacos convencionales que ya no ejercen efecto sobre patógenos multidrogo-resistentes (**Dancer, 2004**).

Según la Organización Mundial de la Salud (2001); el exceso de prescripción y el uso indebido de antibióticos ha llevado a la resistencia de muchos agentes patógenos. En la actualidad nuevas cepas resistentes aparecen con mayor rapidez mientras que la tasa de descubrimiento de nuevos antibióticos ha disminuido notoriamente. Esto ha llevado a la búsqueda de cepas silvestres de actinomicetos productores de nuevos metabolitos en ambientes marinos (**Hentschel et al., 2001**). Por otro lado, el surgimiento de enfermedades emergentes y reemergentes y la aparición cada vez mayor de bacterias multidrogo-resistentes como ***Staphylococcus aureus*** meticilino resistente y ***Escherichia coli*** productor de betalactamasas de espectro extendido, constituyen un serio problema en ambientes hospitalarios, por su resistencia a diferentes antibióticos comercialmente utilizados; alterando su metabolismo y estructura genética.

En Perú, **León et al., (2007)**, aislaron cepas de actinomicetos de las bahías de Ancón (Lima) e Independencia (Ica) con actividad inhibitoria utilizando el método de doble capa aislando los géneros: ***Streptomyces***, ***Nocardia***, ***Thermonoactinomyces***, y observaron halos inhibitorios de hasta 36,75 mm de diámetro, el 50% (31 cepas) mostraron actividad inhibitoria frente a ***Staphylococcus aureus*** multirresistente, el 59% (36 cepas) frente a ***Pseudomonas aeruginosa*** y el 37% (23 cepas) a ambos patógenos. Las cepas de actinomicetos codificadas como M10-77 y I-400A fueron identificadas respectivamente como ***Streptomyces*** y ***Thermonoactinomyces*** y fueron las que exhibieron mayor actividad inhibitoria frente a ***Staphylococcus aureus*** 457 y ***Pseudomonas aeruginosa*** 657.

Por estos antecedentes en el presente trabajo se formulan los siguientes problemas: ¿Qué géneros de actinomicetos habitan las Salinas de Mórrope? y ¿Cuál es la actividad antibacteriana de los actinomicetos aislados frente a ***Staphylococcus aureus*** meticilino resistente y ***Escherichia coli*** productor de

betalactamasas de espectro extendido? Para tal efecto se aislará, caracterizará y determinará la actividad antibacteriana de los actinomicetos aislados de las salinas de Mórrope con la finalidad de seleccionar las mejores cepas que inhiban el crecimiento de ***Staphylococcus aureus*** y ***Escherichia coli*** y de esta manera contribuir con el campo de la medicina para el tratamiento de enfermedades infectocontagiosas.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las salinas solares artificiales se localizan en áreas costeras, y se denominan así porque el agua de mar ingresa a través de una serie de estanques para ser almacenada temporalmente y favorecer la evaporación y posterior concentración de sal. Durante la evaporación, ocurre una precipitación secuencial de carbonato cálcico, sulfato cálcico y finalmente el cloruro sódico en los estanques denominados cristalizadores, de esta manera se genera un gradiente de salinidad a lo largo de todo el proceso y aparecen diversas especies microbianas adaptadas a los diferentes rangos de salinidad (**Maturrano, 2004**).

Según los investigadores, **Ramírez et al., (2006)**, los actinomicetos comprenden un grupo de bacterias Gram positivas que habitan mayormente el suelo sin embargo se han reportado éstos microorganismos en diferentes ambientes salinos como suelos salinos, salinas solares, estanques salinos, lagos salados y mar desarrollándose en extrema salinidad debido a que estas bacterias tienen la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios como solutos compatibles para enfrentar factores de estrés debido a la alta salinidad y altas temperaturas (**Maier et al., 2000, Surajit-Das et al., 2006**).

El proceso de obtención de un metabolito útil para la industria según los investigadores, **Lo et al., (2002); Moncheva et al., (2002); Magarvey et al., (2004) y Newton et al., (2007)**, comienza con el aislamiento y caracterización de los actinomicetos, posteriormente determinan la posible actividad biológica mediante pruebas de screening teniendo en cuenta los siguientes factores: pre-tratamiento de las muestras, medio selectivo y condiciones de cultivo. Se reconocieron aproximadamente 23 000 metabolitos secundarios de origen microbiano, de ellos el 42% son producidos por actinomicetos, siendo el género *Streptomyces* productor de aproximadamente el 55% de los antibióticos conocidos hasta la fecha que han demostrado ser altamente eficientes contra agentes patógenos que afectan a la salud humana, (**Berdy, 2005**).

Los actinomicetos constituyen el reservorio genético más importante de producción de antibióticos y muestran actividades biológicas variadas que pueden ser de tipo antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antiparasitario o antiviral. A estos antibióticos cuyo campo de aplicación se extiende no solamente a los diversos terrenos de la terapéutica humana y veterinaria, sino también a la agricultura, se añaden otros productos como enzimas e inhibidores de enzimas, entre los cuales algunos manifiestan actividades farmacológicas que confirman aún más el interés de estos microorganismos (**Madigan et al., 1998; Leveau & Bouix, 2000**).

Entre los antibacterianos de origen actinomicetal, destaca la rifampicina, producida por ***Nocardia mediterranei***, usada en el tratamiento de la tuberculosis; la nistatina producida ***Streptomyces noursei***, la anfotericina B por ***Streptomyces nodosus*** y la paramomicina, un aminociclitol producido por algunas especies de ***Streptomyces***, utilizada en casos de amebiasis intestinal. Así también, la espiramicina, un macrólido antibacteriano producido por ***Streptomyces ambofaciens*** eficaz, también, en el tratamiento de la toxoplasmosis. Otros antibióticos como las antraciclinas y quinonas, manifiestan actividades anticancerosas importantes, entre ellas la daunorubicina de ***Streptomyces coeruleorubidus*** y ***Streptomyces peucetius*** utilizada en el tratamiento de varios tipos de cáncer y leucemias particularmente (**Lazzarini et al., 2000; Leveau & Bouix, 2000**).

Según la Organización Mundial de la Salud (**OMS, 2001**); el exceso de prescripción y el uso indebido de antibióticos lleva a la resistencia de muchos patógenos siendo la causa principal que cepas resistentes aparezcan con mayor rapidez, mientras que la tasa de nuevos antibióticos ha disminuido notoriamente. **León et al., (2007)**, aislaron un total de 62 actinomicetos de los cuales el 50% (31 cepas) mostraron actividad antibacteriana frente a ***Staphylococcus aureus***, 59% (36 cepas) frente a ***Pseudomonas aeruginosa*** y 37% (23 cepas) frente a ambos patógenos, identificando las cepas I-400A y M10-77 como ***Streptomyces*** y ***Thermoactinomyces*** respectivamente.

Existe un grupo de actinomicetos que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos, acción que puede ser aprovechada para el control biológico de ciertos patógenos. En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen la enfermedad **(Rodríguez, 2002)**. La determinación de la capacidad antagónica de los actinomicetos ocurre en varias etapas, la inicial involucra identificar aquellos que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos filamentosos y levaduras **(Méndez & Mondino, 1999)**.

Phillips (1993) y Merino et al., (2007), describieron la técnica para determinar la actividad antagónica llamada técnica de tapiz con cilindros de agar con crecimiento de actinomicetos que consiste en hacer perforaciones cilíndricas con un instrumento estéril, en varias partes de un medio sólido sobre el cual un cultivo de actinomicetos ha estado creciendo por varios días, luego los cilindros fueron colocados sobre la superficie de un medio de cultivo en el cual se había inoculado alguno de los microorganismos indicadores. Después de un período de incubación, que varió entre 48 a 72 horas, observaron zonas de inhibición, que fueron más grandes mientras mayor fue la actividad antagónica.

Mancilla (2003), aisló 45 cepas de actinomicetos de agua y sedimentos de tres estaciones del litoral de la provincia de Valdivia-Chile de los cuales 86,7% (39 cepas) correspondieron al género ***Streptomyces***, fueron clasificados de acuerdo al color de su micelio aéreo maduro prevaleciendo mayoritariamente las cepas de micelio gris (41,3%), mientras que el menor porcentaje correspondió a cepas de micelio amarillo con 5,13%. De las 45 cepas aisladas, 31 tuvieron actividad antimicrobiana frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**, ***Bacillus subtilis* ATCC 6633**, ***Candida albicans* ATCC 90029** y ***Escherichia coli* ATCC 25922**, pero sólo 4 cepas (12,9%) presentaron actividad inhibitoria frente a ésta última.

Ramesh y Mathivana (2009), señalaron que de un total de 208 actinomicetos aislados de la bahía de Bengal (India), 115 presentaron colonias grisáceas, 79 blancas, 6 azuladas, 7 rosáceas y solo una anaranjada; de todos

ellos el 87,9% (183 cepas) fueron identificadas como *Streptomyces* y 25 cepas pertenecieron a otros géneros. Otros reportes, señalan a ***Streptomyces*** como el género predominante en ambientes marinos, aunque también se reportan otros actinomicetos como ***Actinoplanes***, ***Verrucosispora***, ***Salinispora***, ***Actinomadura***, ***Thermonospora***, ***Kocuria***, ***Dactylosporangium***, ***Virgosporangium***, entre otros (Mincer *et al.*, 2002; Magarvey *et al.*, 2004 y León *et al.*, 2007).

En el 2011, León *et al.*, aislaron y caracterizaron 29 cepas de actinomicetos marinos provenientes de las Bahías de Ancón (Lima) e Independencia (Ica), en dos medios de cultivo Agar Czapeck y Agar Marino, con un mejor crecimiento en el segundo medio. La incubación fue de 5 a 7 días hasta 21 días, observando colonias de 2 a 12 mm de diámetro, ligeramente húmedas y algo brillantes que con el transcurrir del tiempo se tornaron secas y opacas adquiriendo una apariencia yesosa, con una variedad de formas de colonias siendo las más frecuentes las circulares con borde liso y las de bordes muy irregulares, festoneados, dactiliformes y dentados, de las cuales un 62% fueron blanca-grisáceas pulverulentas y un 38% sin pigmentación. Así mismo, los investigadores observaron la actividad inhibitoria de dichas cepas frente a patógenos multidrogoresistentes (MDRs) como ***Staphylococcus aureus*** ATCC 43300 meticilino resistente, reportando halos de inhibición de 11 hasta 77 mm de diámetro, siendo, las cepas de actinomicetos M10-77, I-400A y B1-T61 las más efectivas con 92%; 85,7% y 85,2% de inhibición, respectivamente.

Torres *et al.*, (2012), aislaron un total de 235 cepas de los sedimentos de la bahía Concepción y bahía los Ángeles (México) utilizando la caracterización morfológica tanto de las colonias como de la célula bacteriana así como la genotipificación para identificarlas. Reconocieron 166 cepas del género ***Streptomyces***, 26 cepas del género ***Micromonospora*** y 42 cepas del género ***Salinispora***. Así mismo, mediante la técnica de extracción líquido-líquido con acetato de etilo como disolvente, obtuvieron 69 extractos orgánicos de actinomicetos de los cuales las cepas S-370, S-369 y S-355 en su fracción acuosa (MeOH) mostraron actividad antibacteriana contra ***Staphylococcus***

aureus resistente a meticilina, con valores de actividad de 3%, 6% y 32% respectivamente.

Kumar et al., (2012); aislaron 51 cepas de las Salinas de Kothapattanam Ongole Andra Pradesh (India) a una profundidad de 10 a 25 cm, a las que clasificaron en base a la morfología de las colonias y su apariencia microscópica determinando que el 80% fueron **Streptomyces**, 10% **Actinomyces**, 6% **Nocardia** y el 4% a **Micromonospora** de las cuales sólo 5 cepas codificadas como SRB1, SRB20, SRB25, SRB32 y SRB38, mostraron actividad antibacteriana frente a **Staphylococcus aureus** MDR, siendo la cepa SRB25 la que presentó mayor halo de inhibición, la misma que fue identificada con la ayuda de la clave Nonomura, como **Streptomyces sp.**

En los últimos años se ha incrementado los estudios sobre actinomicetos marinos por su potencial metabólico llegando a purificar e identificar los compuestos bioactivos, como Neocitreaminas I y II y la laidlomycinina purificadas a partir de cepas nuevas de **Nocardia** y **Streptomyces** respectivamente, las cuales resultaron ser muy activos frente a **Staphylococcus aureus** meticilino resistente (**Peoples et al., 2008; Peela et al., 2005; Yoo et al., 2007; Fukumoto et al., 2008**).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio comprende las salinas de Mórrope, perteneciente al distrito del mismo nombre, provincia y departamento de Lambayeque; limitadas por el norte con el Puerto de Bayobar- Piura, por el sur con las Pampas de Salitre-Lambayeque, por el este con la carretera Panamericana Norte y por el oeste con el Océano Pacífico; tienen una extensión aproximada de 10 km de este a oeste y 6 Km de norte a sur (Fig. 1). Las salinas se encuentran a una distancia de 5 km del mar en una zona desértica, pueden variar en coloración que van desde anaranjadas hasta grises y se caracterizan porque la sal es muy compacta, limpia e inodora que facilita el transporte para su comercialización como ingrediente en la alimentación (Fig. 2).



Fig. 1. Ubicación Geográfica de las Salinas de Mórrope en el departamento de Lambayeque.



Fig. 2. Caracterización de las Salinas de Mórrope - Lambayeque.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO

La población estuvo constituida por los actinomicetos halófilos de las salinas de Mórrope y la muestra por los actinomicetos contenidos en 14 unidades de muestreo de agua y sedimento de las salinas de Mórrope.

3.3. MATERIAL BIOLÓGICO

- Actinomicetos halófilos aislados de agua y sedimento de las Salinas de Mórrope.
- Cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido otorgadas por el área de investigación del Hospital Regional de Lambayeque.

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Zonas de muestreo

El muestreo en las Salinas de Mórrope se realizó durante los meses, Diciembre del 2012 y Enero del 2013 y las zonas de muestreo se determinaron por un estudio de análisis no probabilístico estratificado. Para ello se estratificó dos zonas de análisis (zona A y zona B) según **Kumar**

(2012), y se hizo la georeferencia de cada punto de muestreo para su reconocimiento. La zona A y B limitan por el norte con el Puerto de Bayobarrapiura, por el sur con las Pampas de Salitre- Lambayeque, por el este con la carretera Panamericana Norte y por el oeste con el Océano Pacífico. Se tomaron 7 muestras de la zona “A” y 7 muestras de la Zona “B” dando un total 14 muestras, de las cuales 4 fueron colectadas entre 0 y 15 cm de profundidad y las otras 3 entre 20 - 30 cm, tal como se muestra en la Tabla 1 y Figs. 3, 4 y 5.

Tabla 1. Número de muestras obtenidas según la zona de muestreo (A y B), profundidad y georeferencia en las Salinas de Mórrope

Salinas de Mórrope									
Zona de muestreo	Profundidad de colecta de muestra (cm)	0	5	10	15	20	25	30	Total muestras
Zona A (Diciembre 2012)	Ubicación geográfica	6°10S;80°35 W	6°11S;80°37 W	6°9S;80°39W					7
		(2 muestras)	(2 muestras)	(3 muestras)					
Zona B (Enero 2013)	Ubicación geográfica	6°19S;80°28 W	6°17S;80°26 W	6°18S;80°27W					7
		(2 muestras)	(2 muestras)	(3 muestras)					

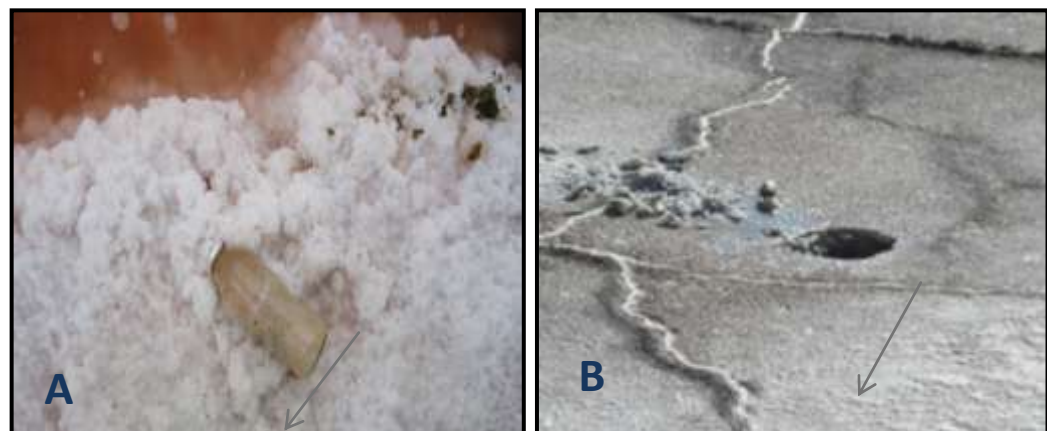


Fig. 3. Toma de muestra de agua y sedimento salino a nivel de superficie (A) y profundidad (B) en las Salinas de Mórrope.



Fig. 4. Georeferencia de la zona A con sus 7 puntos de muestreo.

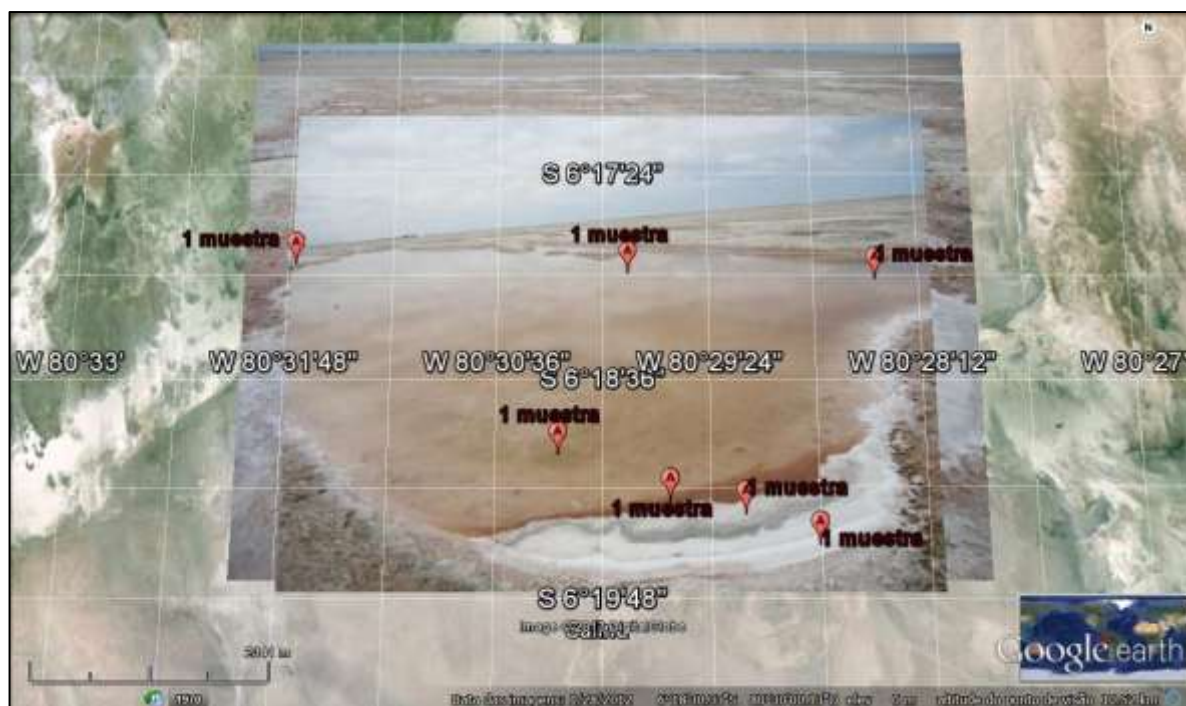


Fig. 5. Georeferencia de la zona B con sus 7 puntos de muestreo.

3.4.2. Toma de muestra

Las muestras fueron colectadas en frascos de vidrio con tapas de rosca estériles de 600 ml de capacidad, en dos zonas de referencias que presentaron las siguientes dimensiones: 25 m² y 15 m² aproximadamente. Los frascos fueron colocados en cajas térmicas con bolsas de hielo y se transportaron al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de CCBB. Cada muestra fue identificada con un código, fecha del muestreo, profundidad de la muestra, color de la muestra, pH y ubicación de la misma.

3.4.3. Enriquecimiento de los actinomicetos

Para el enriquecimiento de los actinomicetos, se utilizaron botellas con 10 mL de Caldo Sales Doble Concentrado Enriquecido con Extracto de levadura 0.6 % y glucosa 2% a pH 7.0, las mismas que fueron inoculadas con 10 mL de muestra de agua y sedimento de las Salinas previamente homogenizada y llevadas a baño de agua a 50°C por 60 minutos con la finalidad de disminuir la carga contaminante (**Pisano et al., 1986 y Takizawa et al., 1993**). Luego las botellas se incubaron a una temperatura de 35°C durante cinco días en aerobiosis, después de este tiempo se hizo la observación microscópica con la finalidad de comprobar la existencia de estos microorganismos.

3.4.4. Aislamiento de los actinomicetos

Para el aislamiento de actinomicetos se utilizaron placas con Agar Marino Modificado (Anexo 1) y la siembra se realizó en superficie a partir de los enriquecimientos con aparente crecimiento confirmado en observación microscópica. Las placas se incubaron a 35°C durante 2 días y luego continuó la incubación a 30°C hasta completar 7 días, evaluando luego el desarrollo de colonias características y tomando en cuenta criterios como aspectos

macroscópicos de forma, tamaño, elevación, consistencia, color de las colonias así como aspectos microscópicos caracterizando los filamentos aéreos, de sustrato, así como filamentos reproductores. Cada una de las cepas aisladas se le asignó una clave con las siglas contiguas de las que se describió a la muestra (Morsa - N° de muestra- N° de cepa, ejemplo: **Morsa 01-01**) y conservadas luego en refrigeración hasta su posterior estudio.

3.4.5. Determinación del crecimiento de actinomicetos en medio líquido

Los actinomicetos fueron inoculados en caldo extracto levadura, a una concentración de 3.0% de NaCl, se incubaron a 35°C durante 2 días y luego continuó la incubación a 30°C hasta completar 5 días. Para caracterizar el crecimiento de los actinomicetos en medio líquido se realizó un seguimiento diario durante el transcurso del periodo de incubación, tomando en cuenta criterios como inicio de desarrollo, formación de colonias en la superficie o fondo del tubo, tiempo de desarrollo y producción de pigmento difusible.

3.4.6. Prueba de tolerancia salina de actinomicetos

Para evaluar la tolerancia salina, los actinomicetos fueron inoculados en caldo extracto levadura, a concentraciones de 0; 3.0; 6.0; 8.0; 12.0 y 15.0 % de NaCl. Los cultivos se incubaron a 35°C durante 3 días, evaluando luego el rango de crecimiento de los actinomicetos en las diferentes concentraciones de NaCl.

3.4.7. Identificación de los actinomicetos

Para la identificación de los actinomicetos se utilizó la técnica de cultivo en laminilla descrita por **Díaz corrales et al., (1997)**, que consistió en introducir laminillas estériles con una inclinación de 45°C en placas con AMMO, previamente cultivadas con la cepa de actinomiceto. Después de un periodo de incubación de siete días a una temperatura de 35° y 30° respectivamente, las

laminillas fueron teñidas con la técnica de Gram para la observación microscópica de filamentos aéreos, de sustrato y reproductor. Los aislamientos se identificaron siguiendo los criterios de Holt *et al.*, (1994) basado en la morfología y fisiología bacteriana.

3.4.8. Estandarización de cepas indicadoras

Las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron analizadas y seleccionadas en el Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación del Hospital Regional de Lambayeque, las mismas que fueron reactivadas en caldo tripticasa soya y luego cultivadas en Agar manitol salado y agar Mc Conkey respectivamente. Para la estandarización de la cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente se realizó la prueba de sensibilidad antimicrobiana a Oxacilina por el método de Kirby Bauer estandarizado por el CLSI y referenciado en el Manual de Procedimientos en el Análisis Microbiológico - INS (2002); mientras que la cepa de *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido fue estandarizada a través del método fenotípico de Jarlier - Sociedad Francesa estandarizado por la Sociedad Internacional de Laboratorios clínicos (CLSI) y posteriormente se confirmó la presencia del gen CTX-M por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR.

3.4.9. Determinación de la actividad antibacteriana

A las cepas codificadas e identificadas se determinó la actividad antibacteriana empleando el método de los “cilindros de agar” (Phillips, 1993) modificado por los autores de la tesis, para ello; se realizó, perforaciones cilíndricas con un instrumento estéril de 8 mm de diámetro, en varias partes de un agar marino sobre el cual un cultivo de actinomicetos estuvo creciendo por varios días. Luego los cilindros fueron colocados en “pocillos” del mismo diámetro preparados en placas de medio Müller-Hinton sembradas previamente con las

cepas indicadoras, ***Staphylococcus aureus* meticilino-resistente** y ***Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido**. Posteriormente las placas se incubaron a 35°C por 24 horas, después de este tiempo las placas fueron evaluadas, y se midió el diámetro de los halos de inhibición.

3.4.10. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos en la caracterización e identificación de los actinomicetos, se aplicó la estadística descriptiva representada en tablas y figuras de Microsoft Excel así mismo se utilizó modelos de sumarización de datos a través de la estadística de centralización (promedios), se realizaron pruebas ANAVA y prueba de TUKEY en la formulación del análisis de los promedios de los halos de inhibición, (Alvítres, 2000).

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización de las muestras de dos zonas de muestreo en las salinas de Mórrope

Las muestras de las zonas A y B se diferenciaron por el color, olor y pH. Se observaron cinco tonalidades diferentes que variaron del anaranjado, pardo-anaranjado, pardo, gris y negro; el olor fue a tierra húmeda y a tierra enmohecida y sin olor; el pH varió de 7.0 a 7.5. Además se tomó en cuenta la constitución de las muestras, las mismas que variaron de acuerdo al porcentaje de agua y sedimento contenida en cada muestra, de 50 a 100% de agua, de 10 a 50 y 100% de sedimento distribuidas al azar en las muestras como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización de 14 muestras de agua y sedimento de las zonas de muestreo, A y B de las salinas de Mórrope.

	Nº de muestra	Caracterización de las muestras			
		Color	Olor	pH	Contenido
ZONA A	01	Anaranjado	Inodora	7.0	Agua (100%)
	02	Anaranjado-pardo	Inodora	7.0	90% Agua y 10% precipitado salino
	03	Anaranjado-pardo	Inodora	7.0	80% Agua y 20% precipitado salino
	04	Parda- gris	Inodora	7.0	70% Agua y 30% precipitado salino
	05	Parda	Tierra húmeda	7.5	60% Agua y 40 % precipitado salino
	06	Negra	Tierra mohecida maloliente	7.5	50% Agua y 50 % precipitado salino
	07	Parda	Tierra mohecida maloliente	7.5	100 % precipitado salino
ZONA B	08	Parda- gris	Inodora	7.0	Agua (100%)
	09	Parda- gris	Inodora	7.0	90% Agua y 10% precipitado salino
	10	Anaranjado	Inodora	7.0	80% Agua y 20% precipitado salino
	11	Parda	Inodora	7.0	70% Agua y 30% precipitado salino
	12	Parda- gris	Tierra húmeda	7.5	60 % Agua y 40 % precipitado salino
	13	Parda	Tierra mohecida maloliente	7.5	50 % Agua y 50 % precipitado salino
	14	Parda	Tierra mohecida maloliente	7.5	100 % precipitado salino

4.2. Caracterización del crecimiento de los actinomicetos halófilos en medio sólido

El crecimiento de los actinomicetos en agar marino se observó a partir del cuarto día alcanzando su máximo entre 7 y 15 días de incubación; las colonias mostraron un desarrollo variable desde menores a 1 mm hasta colonias de 6,5 mm de diámetro, la mayoría fueron inicialmente colonias húmedas y algo brillantes, pero con el tiempo cambiaron a opacas y secas, muchas de ellas con fuerte olor a geosminas una sustancia química de naturaleza sesquiterpenoide.

De las 37 colonias seleccionadas por su forma y color, 11 fueron circulares y blancas, 9 cremas, 4 grises, 5 pardas y 2 amarillas; 3 fueron colonias irregulares y cremas y una amarilla. Una colonia tuvo la forma crateriforme y fue de color pardo y una colonia filamentosa y gris como se observa en la Fig. 6.

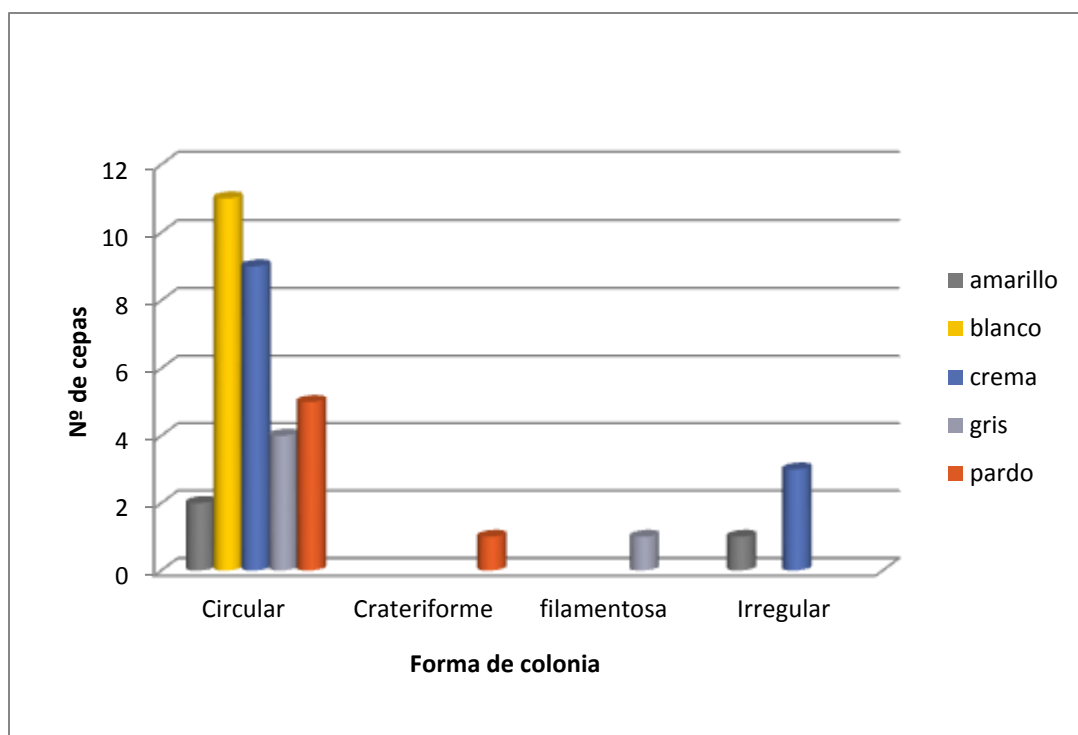


Fig. 6. Numero de cepas de actinomicetos según, color y forma de las colonias en agar marino modificado.

4.3. Caracterización del crecimiento de los actinomicetos halófilos en medio líquido salino

El crecimiento medio líquido salino se caracterizó por la formación de una capa gruesa en la superficie del medio en la mayoría de cepas, mientras que con otras su crecimiento fue en el fondo. Del total de cepas seleccionadas 14 de ellas, desarrollaron en la superficie y sin producción de pigmento difusible (A); 11 cepas desarrollaron en la superficie y produjeron pigmento difusible marrón claro (B); 10 cepas, inicialmente formaron pequeños conglomerados en el fondo y con el tiempo aparecieron pequeñas colonias en la superficie, 5 de ellas solamente produjeron pigmento marrón claro (C) y 2 cepas crecieron lentamente del tubo de las cuales una produjo pigmento difusible marrón claro (D). Fig. 7 y 8

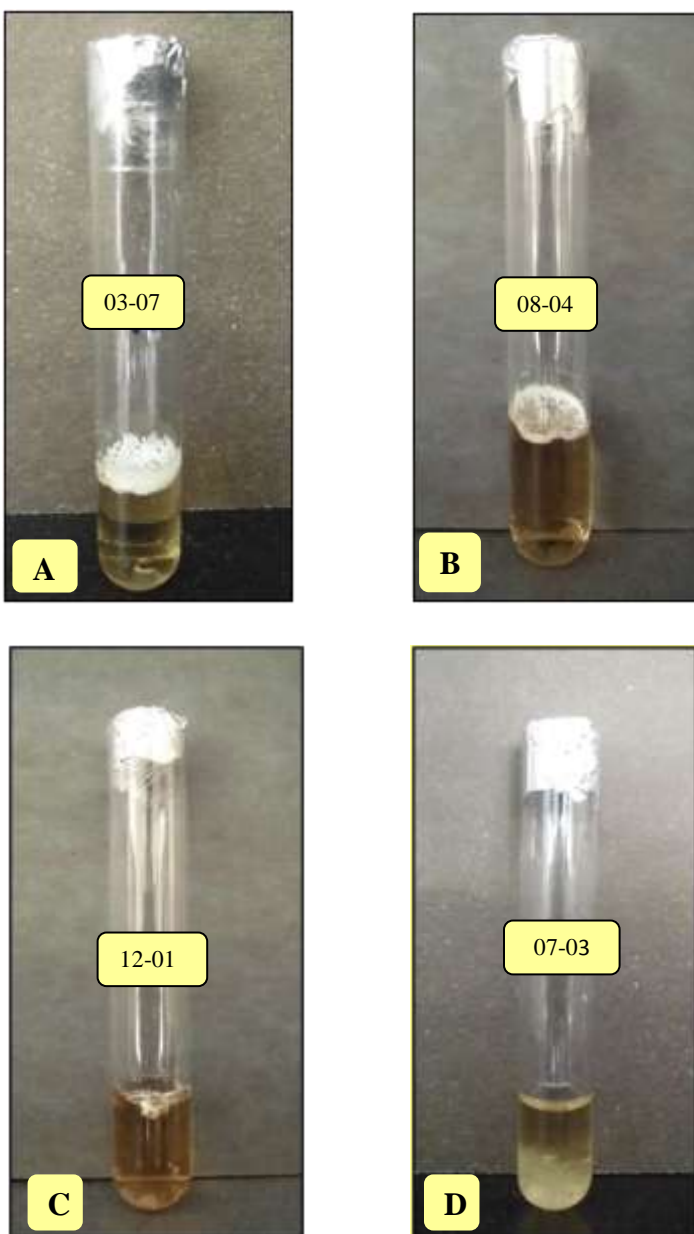


Fig. 7. Características del crecimiento de actinomicetos en caldo salino de cuatro cepas, A, B, C y D.

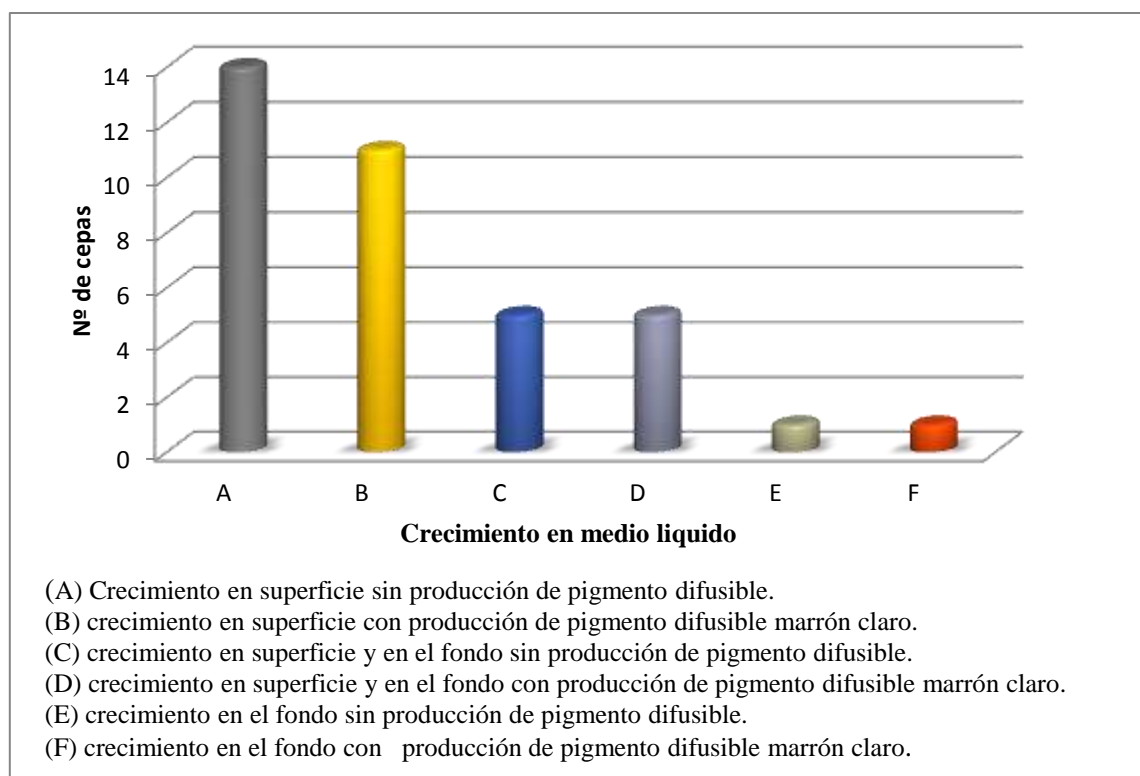


Fig. 8. Número de cepas de actinomicetos según las características de crecimiento (A, B, C, D, E y F) en medio líquido salino

4.4. Tolerancia de los actinomicetos a diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio

El crecimiento de los actinomicetos se observó en medio líquido con diferentes concentraciones de NaCl (3, 6, 8, 12 y 15%) y en medio sin sal con la finalidad de demostrar su tolerancia o exigencia a la misma. 8 cepas crecieron en el rango de 0 a 6% de NaCl, 19 en el rango de 0 a 8%, 3 en el rango de 0 a 12% y una en el rango de 0 a 15% lo que demuestra que estas cepas se comportan como halotolerantes; mientras que 2 cepas crecieron en el rango de 3 a 6% de NaCl, una en el rango de 3 a 8%, 2 de 3 a 12% y una de 3 a 15% demostrando que 6 cepas fueron halófilas como se observa en la Fig. 9.

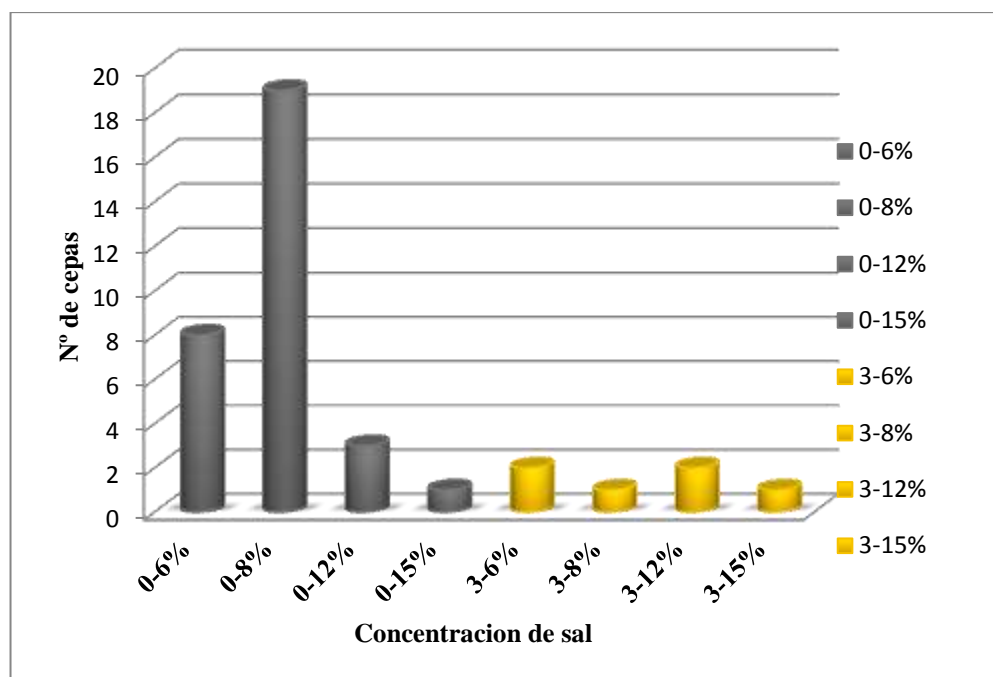


Fig. 9. Número de cepas de actinomicetos que crecieron en rangos salinos desde 0-15% y desde 3-15%.

4.5. Identificación de los actinomicetos aislados de las salinas de Mórrope

La identificación de los actinomicetos se hizo en base a criterios macroscópicos (forma, borde, tamaño, consistencia, color de micelio aéreo y de sustrato de la colonia) y microscópicos (filamento aéreo, de sustrato y filamento reproductor) de los cuales en el 64.9% (24 cepas) se observaron filamentos largos, ramificados y filamentos reproductores sin fragmentación que corresponden al género ***Streptomyces***. El 10.8% (4 cepas) mostraron filamentos cortos pero con filamentos reproductores fragmentados dejando en libertad formas cocobacilares, estos fueron identificados como del género ***Nocardia***. El 24.3% del total de cepas (9 cepas) fueron clasificadas por su morfología como perteneciente al orden actinomicetales, Figs. 10, 11 y 12.


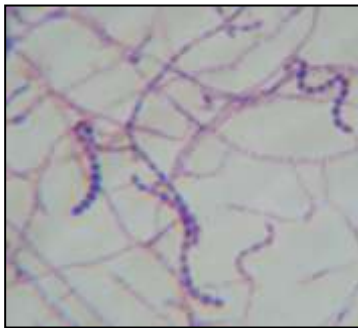

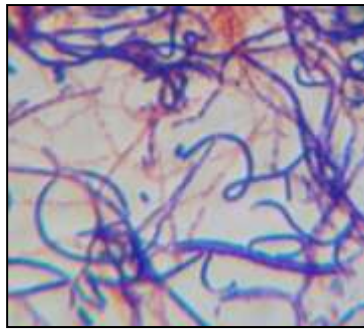




<i>Código</i>	<i>Colonia</i>	<i>Descripción de colonia</i>	<i>Morfología microscópica</i>
Morsa 01-04		<p>Forma: irrcular.</p> <p>Consistencia: seca.</p> <p>Borde:filamentoso.</p> <p>Tamaño: 2.5 mm.</p> <p>Color de filamento aéreo: crema.</p> <p>Color de filamento de sustrato: amarillo.</p>	
Morsa 03-06		<p>Forma: circular.</p> <p>Consistencia: seca.</p> <p>Borde: entero.</p> <p>Tamaño: 2.5 mm.</p> <p>Color de filamento aéreo: blanco.</p> <p>Color de filamento de sustrato: blanco.</p>	
Morsa 07-02		<p>Forma: circular.</p> <p>Consistencia: seca.</p> <p>Borde: filamentoso.</p> <p>Tamaño: 1.5 mm.</p> <p>Color de filamento aéreo: blanco.</p> <p>Color de filamento de sustrato: crema.</p>	
Morsa 08-04		<p>Forma: circular.</p> <p>Consistencia: filamentosa.</p> <p>Borde: filamentoso.</p> <p>Tamaño: 1.0 mm.</p> <p>Color de filamento aéreo: gris.</p> <p>Color de filamento de sustrato: amarillo.</p>	

Fig. 10. Caracterización de colonias y filamentos vegetativos y reproductores de cuatro cepas de actinomicetos, Morsa 01-04, Morsa 03-06, Morsa 07-02 y Morsa 08-04 que pertenecen al género ***Streptomyces***


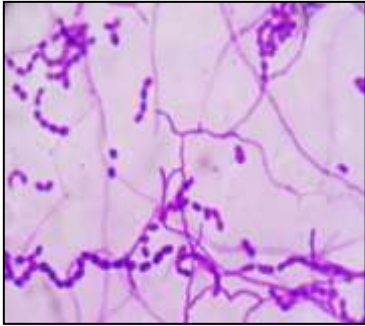

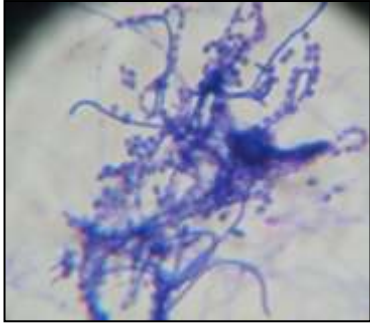

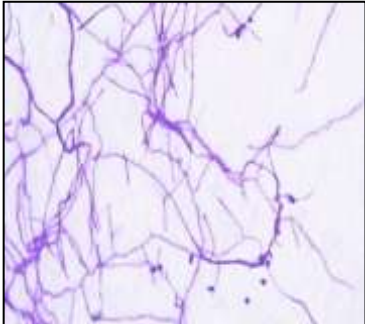

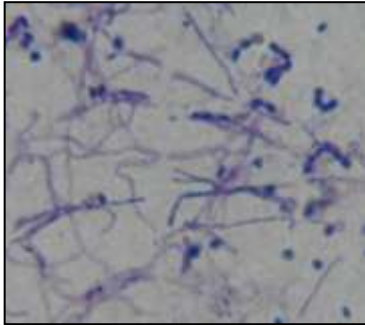
<i>Código</i>	<i>Colonia</i>	<i>Descripción de la colonia</i>	<i>Morfología microscópica</i>
Morsa 01-03		<p> <i>Forma: circular.</i> <i>Consistencia: seca.</i> <i>Borde: filamentoso.</i> <i>Tamaño: 3.0 mm.</i> <i>Color de filamento aéreo: crema.</i> <i>Color de filamento de sustrato: crema.</i> </p>	
Morsa 01-05		<p> <i>Forma: circular.</i> <i>Consistencia: seca.</i> <i>Borde: filamentoso.</i> <i>Tamaño: 1.5 mm.</i> <i>Color de filamento aéreo: blanco-grisáceo.</i> <i>Color de filamento de sustrato: amarillo.</i> </p>	
Morsa 08-02		<p> <i>Forma: circular.</i> <i>Consistencia: seca.</i> <i>Borde: filamentoso.</i> <i>Tamaño: 1.0 mm.</i> <i>Color de filamento aéreo: crema.</i> <i>Color de filamento de sustrato: crema.</i> </p>	
Morsa 14-02		<p> <i>Forma: circular.</i> <i>Consistencia: seca.</i> <i>Borde: filamentoso.</i> <i>Tamaño: 1.5 mm.</i> <i>Color de filamento aéreo: blanco.</i> <i>Color de filamento de sustrato: blanco.</i> </p>	

Fig. 11. Caracterización de colonias y filamentos vegetativos y reproductores de cuatro cepas de actinomicetos, Morsa 01-03, Morsa 01-05, Morsa 08-02 y Morsa 14-02 que pertenecen al género ***Nocardia***


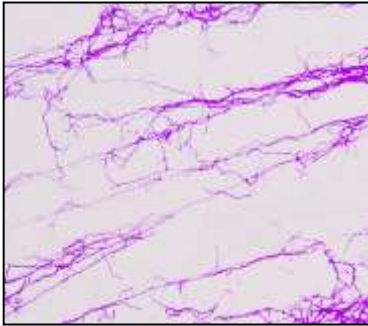






Código	Colonia	Descripción de colonia	Morfología microscópica
Morsa 03-03		<p>Forma: circular. Consistencia: seca. Borde: irregular. Tamaño: 4.0 mm. Color de filamento aéreo: blanco. Color de filamento de sustrato: crema.</p>	
Morsa 10-01		<p>Forma: circular. Consistencia: seca. Borde: entero. Tamaño: 1.5 mm. Color de filamento aéreo: crema. Color de filamento de sustrato: crema.</p>	
Morsa 12-04		<p>Forma: circular. Consistencia: seca. Borde: ondulado Tamaño: 2.0 mm. Color de filamento aéreo: amarillo. Color de filamento de sustrato: amarillo.</p>	
Morsa 13-02		<p>Forma: circular. Consistencia: seca. Borde: irregular. Tamaño: 3.0 mm. Color de filamento aéreo: crema. Color de filamento de sustrato: crema.</p>	

Fig. 12. Caracterización de colonias y filamentos vegetativos y reproductores de cuatro cepas de actinomicetos, Morsa 03-03, Morsa 10-01, Morsa 12-04 y Morsa 13-02 que pertenecen a otros géneros, no identificados

4.6. Actividad antibacteriana de actinomicetos halófilos frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Del total de 37 cepas de actinomicetos aislados, el 70.3% (26 cepas) mostraron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. La cepa Morsa 05-01 alcanzó un halo de actividad de 40 mm de diámetro frente a *Staphylococcus aureus*, igualmente la cepa Morsa 04-03 que alcanzo un halo de actividad de 37 mm de diámetro frente al mismo patógeno (Fig. 13); mientras que la cepa Morsa 02-09 mostró una actividad más baja con 15 mm de diámetro de halo de actividad (Tabla 3).

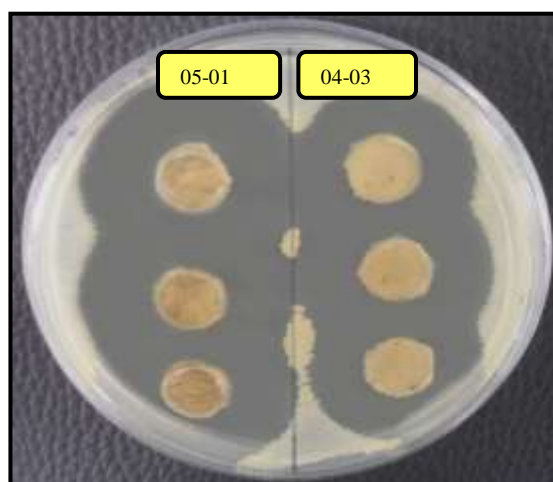


Fig. 13. Halos de actividad de las cepa de actinomicetos Morsa 05-01 y Morsa 04-03 con tres repeticiones frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Tabla 3. Halos de actividad inhibitoria en mm de 26 cepas de actinomicetos frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente.

CEPA	Halo de actividad (mm)	CEPA	Halo de actividad (mm)
MORSA 01-01	31.3	MORSA 05-01	40
MORSA 01-03	21.3	MORSA 05-02	25.3
MORSA 01-04	28.3	MORSA 07-01	28.3
MORSA 01-05	29	MORSA 07-02	27.7
MORSA 02-03	33	MORSA 07-03	30.3
MORSA 02-09	15	MORSA 08-02	24.7
MORSA 03-03	30	MORSA 08-03	28.3
MORSA 03-05	36	MORSA 08-04	34.3
MORSA 03-06	24.3	MORSA 09-01	27
MORSA 03-07	31	MORSA 12-01	30.7
MORSA 04-01	20.3	MORSA 12-04	29.7
MORSA 04-02	36	MORSA 13-05	30
MORSA 04-03	37	MORSA 14-02	35

El análisis de Varianza de los promedios de los halos de inhibición de los actinomicetos frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente demuestra que existe diferencias significativas entre las cepas, rechazando la H_0 que plantea que los promedios de los halos de inhibición son iguales (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de Varianza de los promedios de los halos de inhibición de actinomicetos halófilos frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

H_0 : Los promedios de halos de inhibición son iguales en las 26 cepas de actinomicetos.

Fuente de variación	Fc	Ft(0.05)	DECISION
Halos de inhibición	160.669	1.719	Rechazar H_0

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de actividad de las 26 cepas de actinomicetos frente a ***Staphylococcus aureus*** meticilino resistente confirma que la cepa Morsa 05-01 alcanzó el promedio más alto (40 mm de diámetro); mientras que la cepa Morsa 02-09 el promedio más bajo (15 mm de diámetro) como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de inhibición de los actinomicetos halófilos frente a ***Staphylococcus aureus*** meticilino resistente.

H_0 : No existe diferencia significativa en los promedios de los halos de inhibición de las 26 cepa de actinomicetos frente a ***Staphylococcus aureus*** meticilino resistente.

CEPAS	PROMEDIO	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
MORSA 02-09	15,00	a												
MORSA 04-01	20,33		b											
MORSA 01-03	21,33		b											
MORSA 08-02	24,67			c										
MORSA 05-02	25,33			c	d									
MORSA 03-06	25,67			c	d									
MORSA 09-01	27,00			c	d	e								
MORSA 07-02	27,67				d	e	f							
MORSA 07-01	28,33					e	f	g						
MORSA 01-04	28,33					e	f	g						
MORSA 08-03	28,33					e	f	g						
MORSA 01-05	29,00					e	f	g	h					
MORSA 12-04	29,67						f	g	h					
MORSA 13-05	30,00						f	g	h					
MORSA 03-03	30,00						f	g	h					
MORSA 07-03	30,33							g	h					
MORSA 12-01	30,67							g	h	i				
MORSA 03-07	31,00								h	i				
MORSA 01-01	31,33								h	i				
MORSA 02-03	33,00									i	j			
MORSA 08-04	34,33										j	k		
MORSA 14-02	35,00										j	k	l	
MORSA 04-02	36,00											k	l	
MORSA 03-05	36,00											k	l	
MORSA 04-03	37,00												l	
MORSA 05-01	40,00													m

4.7. Actividad antibacteriana de actinomicetos frente a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido

Del total de 37 cepas de actinomicetos aislados, el 72.9% (27 cepas) mostraron actividad frente a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido. En la Fig. 14 se observa que la cepa Morsa 05-01 y la cepa Morsa 11-03 alcanzaron los promedios de actividad más alto con 36 y 31.7 mm de diámetro de halo respectivamente, mientras que la cepa Morsa 03-05 mostró la actividad más baja con 10 mm de halos de actividad como se observa en la Tabla 6.

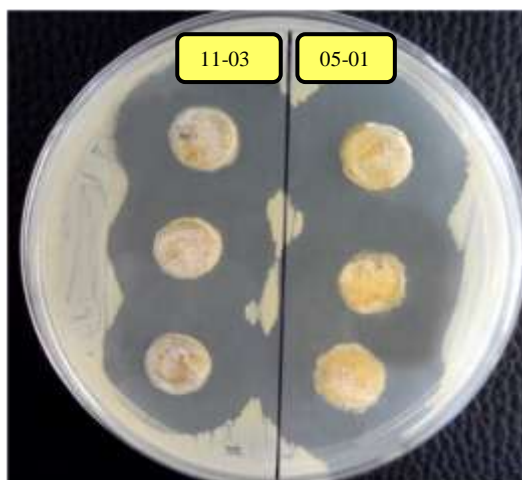


Fig. 14. Halos de inhibición del crecimiento de la cepa de actinomicetos Morsa 05-01 con tres repeticiones frente a *E. coli* productor de betalactamasas de espectro extendido.

Tabla 6. Halos de actividad inhibitoria en mm de 27 cepas de actinomicetos halófilos frente a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido.

CEPA	Halo de actividad (mm)	CEPA	Halo de actividad (mm)
MORSA 01-01	24,3	MORSA 07-02	29
MORSA 01-02	22.3	MORSA 07-03	27
MORSA 01-04	25	MORSA 08-02	20.3
MORSA 01-05	25.7	MORSA 08-03	31
MORSA 02-03	20	MORSA 08-04	21.7
MORSA 02-09	15.3	MORSA 09-01	21
MORSA 03-04	20	MORSA 11-03	24.3
MORSA 03-05	10	MORSA 12-01	24.3
MORSA 03-07	31.7	MORSA 12-04	31
MORSA 04-01	18	MORSA 13-05	24
MORSA 04-03	31	MORSA 13-06	31.7
MORSA 05-01	36	MORSA 14-02	29
MORSA 05-02	20.3	MORSA 14-03	29.7
MORSA 07-01	29.7		

En la tabla 7 se registra el análisis de Varianza de los promedios de los halos de inhibición frente a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido observando que existe diferencia significativa entre las cepas, como lo confirma el valor elevado de Fc (Factor calculado), rechazando la hipótesis nula que los promedios de halos de inhibición del crecimiento frente a *E. coli* son iguales.

Tabla 7. Análisis de Varianza de los promedios de los halos de inhibición del crecimiento de actinomicetos frente *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido.

H₀: Los valores promedios de halos de inhibición son iguales en las 27 cepas de actinomicetos.

Fuente de variación	Fc	Ft(0.05)	DECISION
Halos de inhibición	247,430	1.701	Rechazar Ho

Las comparaciones múltiples de Tukey confirman que existen diferencias significativas entre los promedios pero las cepas, Morsa 05-01 y Morsa 11-03 alcanzaron los promedios más altos con 36 mm y 34,33 mm respectivamente, mientras que la cepa Morsa 03-05 alcanzó el promedio más bajo (Tabla 8).

Tabla 8. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de inhibición del crecimiento de actinomicetos frente a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido.

H_0 : No existe diferencia significativa en los promedios de los halos de inhibición del crecimiento de 27 cepas de actinomicetos frente a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido.

CEPA	PROMEDIO	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
MORSA 03-05	10	a											
MORSA 02-09	15,33		b										
MORSA 04-01	18			c									
MORSA 02-03	20			c	d								
MORSA 03-04	20			c	d								
MORSA 05-02	20,33				d	e							
MORSA 08-02	20,33				d	e							
MORSA 09-01	21				d	e							
MORSA 08-04	21,66				d	e							
MORSA 01-02	22,33					e	f						
MORSA 13-05	24						f	g					
MORSA 12-01	24,33						f	g					
MORSA 01-01	24,33						f	g					
MORSA 01-04	25							g	h				
MORSA 01-05	25,66							g	h				
MORSA 07-03	27								h	i			
MORSA 07-02	29									i	j		
MORSA 14-02	29									i	j		
MORSA 07-01	29,66										j	k	
MORSA 14-03	29,66										j	k	
MORSA 04-03	31										j	k	
MORSA 12-04	31										j	k	
MORSA 08-03	31										j	k	
MORSA 13-06	31,66											k	
MORSA 03-07	31,66											k	
MORSA 11-03	34,33												l
MORSA 05-01	36												l

4.8. Categorización de los actinomicetos con actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido

En la categorización se tuvo en cuenta las recomendaciones del manual de procedimiento en el tratamiento de muestras bacteriológicas del INS (2002). Se observa en la Fig. 15 que 14 cepas de actinomicetos inhibieron el desarrollo de *Staphylococcus aureus* con una actividad buena (20-30 mm de diámetro halo de inhibición), igualmente 13 cepas frente a *Escherichia coli*, mientras que 10 cepas tuvieron una actividad muy buena (30-40 mm) con *Staphylococcus aureus* y 7 cepas frente a *Escherichia coli*. Con actividad leve (5-10 mm) solo una cepa de actinomicetos actuó sobre *Escherichia coli* y ninguno frente a *Staphylococcus aureus*; mientras que con actividad moderada (10-20 mm) sólo 6 cepas frente a *Escherichia coli* y 2 cepas frente a *Staphylococcus aureus*.

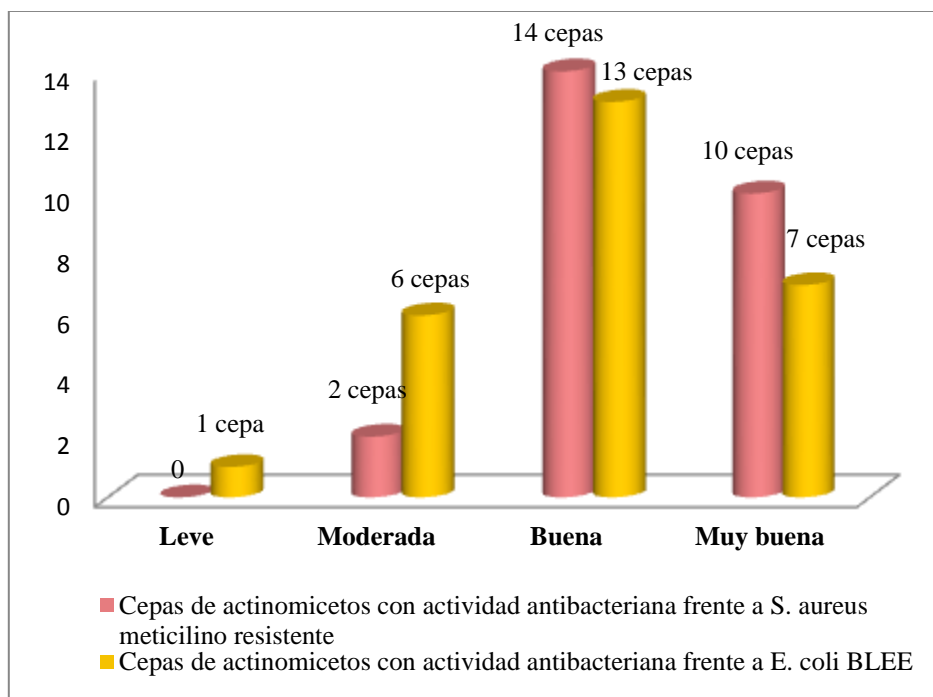


Fig. 15. Categorización de los actinomicetos con respecto a su actividad frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido.

4.9. Distribución de los actinomicetos con actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Escherichia coli* BLEE en las dos zonas de muestreo

Del total de cepas de actinomicetos que tuvieron actividad frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (26 cepas), 2 cepas con actividad moderada fueron aisladas de la zona A, 14 cepas con actividad buena se aislaron tanto de la zona A (9 cepas) como de la zona B (5 cepas) y 10 cepas con actividad muy buena fueron aisladas de ambas zonas, 7 cepas de la zona A y 3 cepas de la zona B como se observa en la Fig. 16.

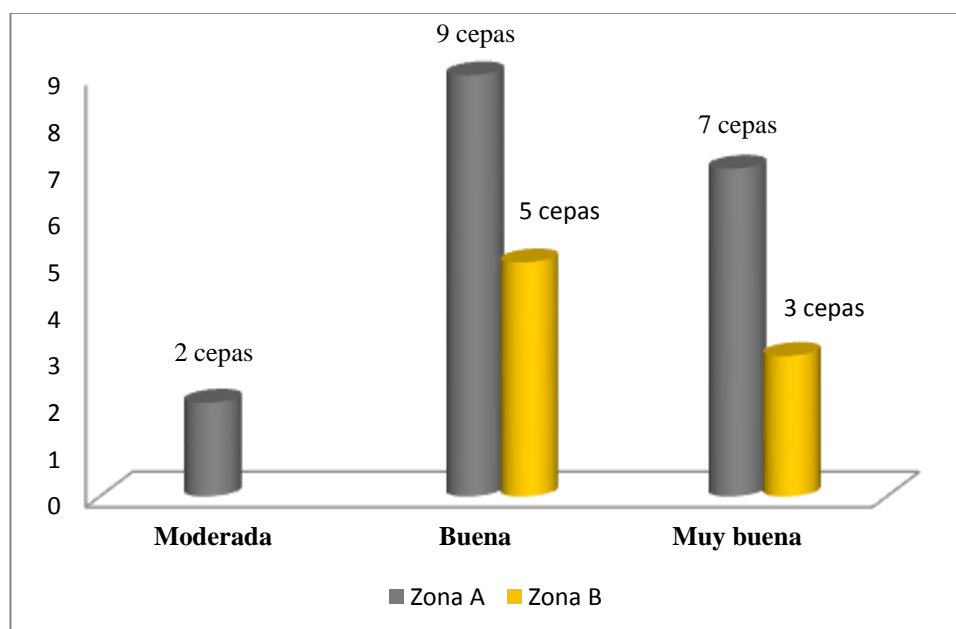


Fig. 16. Número de cepas de actinomicetos con actividad inhibitoria distinta frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, distribuidos en la zona A y Zona B

Asimismo, de las 27 cepas de actinomicetos que tuvieron actividad frente a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido, una cepa de la zona A mostró actividad LEVE y fue aislada de la zona A, 6 cepas con actividad MODERADA se aislaron tanto de la zona A (5 cepas) como de la zona B (una cepa); 13 cepas con actividad BUENA fueron aisladas tanto de la zona A (7 cepas) como de la zona B (6 cepas) y con actividad MUY BUENA solo 7 cepas, 3 de la zona A y 4 de la zona B como se observa en la Fig. 17.

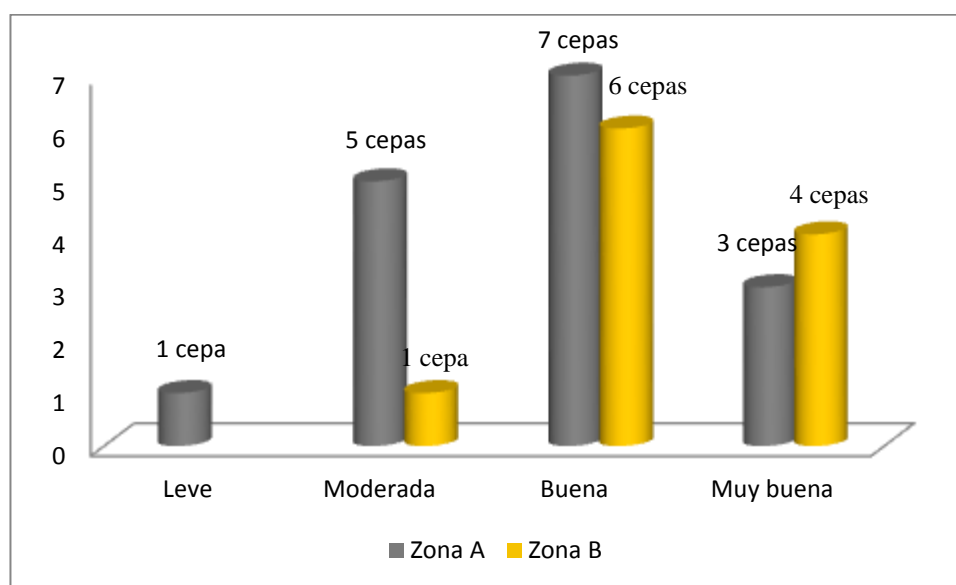


Fig. 17. Número de cepas de actinomicetos con actividad inhibitoria distinta frente a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido, distribuidos en la zona A y Zona B

V. DISCUSIÓN

Los futuros programas de “screening” van orientados a la búsqueda de nuevos metabolitos con potencial farmacológico en ambientes no explorados. Hasta ahora ésta búsqueda de microorganismos productores de nuevas moléculas bioactivas se ha enfocado en este tipo de ambientes, siendo los actinomicetos y los hongos los más antagónicos, constituyendo un importante recurso para la obtención de nuevos productos naturales para el tratamiento de enfermedades infecciosas (**Mancilla, 2003**). Si bien los actinomicetos del suelo siguen constituyendo una fuente de nuevos metabolitos de interés farmacológico, la disminución en la tasa de descubrimiento de nuevas moléculas ha llevado a reorientar la búsqueda hacia otros ambientes como agua, sedimentos marinos, invertebrados marinos y salinas con el fin de aislar actinomicetos con capacidad de producir sustancias inhibitorias contra patógenos multidrogo-resistentes (**Mancilla, 2003; Kumar et al., 2012; Torres et al., 2012**)

Las salinas costeras generalmente contienen concentraciones de sales iguales o superiores al agua marina, donde habitan una gran diversidad de microorganismos adaptados a condiciones restrictivas de temperatura, pH, salinidad y contenido iónico (**Benloch et al., 2002, Sanchez et al., 2003**). Todos los microorganismos en estudio demostraron ser capaces de crecer en un rango de salinidad de 0 a 15%; además de presentar en su mayoría una concentración salina optima de 3 y 6%; en base a ello y desde un punto de vista fisiológico se puede inferir válidamente que todos los aislados son halófilos moderados (**Ventosa et al., Benloch et al., 2002**).

El agar marino modificado por los autores, tuvo un buen rendimiento en el aislamiento de los actinomicetos, como se demuestra en los resultados obtenidos en el presente trabajo a pesar de que este medio es muy útil generalmente en el aislamiento de heterótrofos marinos. Otros autores como Pisano **et al.**, (1986); Takizawa **et al.**, (1993) refieren que para el aislamiento de actinomicetos, se

deben utilizar medios enriquecidos como el agar Caseína - Almidón, agar Czapeck, etc. En los cuales obtuvieron un óptimo rendimiento para la recuperación de actinomicetos marinos, por lo contrario León *et al.*, (2007) reportaron un 75% de rendimiento del agar marino en el aislamiento de actinomicetos marinos en comparación con el agar Caseína - Almidón, esto se fundamenta básicamente a que probablemente este medio incluye como fuente de sales e iones inorgánicos suplementadas en el agua de las mismas salinas, los cuales son nutrientes representativos de los utilizados por los microorganismos en el medio marino según la investigación por Flores *et al.*, (2010).

Las colonias de los actinomicetos presentaron diferencias morfológicas siendo las más frecuentes las colonias circulares seguidas de las formas irregulares y las colonias blancas (29.7%) seguidas de las cremas (24.3%) sin embargo León *et al.*, (2007), encontraron que las colonias más frecuentes fueron las formas circulares e irregulares, pero las colonias blancas representaron el 37.1% y observó grisáceas que representaron el 29.03% resultados que difieren con los encontrados en el presente trabajo con relación al color y porcentualmente la diferencia se deba a las técnicas de aislamiento y cultivos de actinomicetos, además de las características de las zonas de muestreo.

En el presente estudio, se observó un predominio del genero ***Streptomyces*** (64.9%) seguido por el género ***Nocardia*** (10.8%) y el 24.3% de las cepas que no fueron identificadas pertenecieron a otros géneros del orden *Actinobacteria* por su morfología característica como es la morfología filamentosa. Kumart *et al.*, (2012) en su estudio realizado en las Salinas de Kothapattanam Ongole Andra Pradesh (India) en muestras de sedimento colectadas a una profundidad de 10 a 25 cm, reportaron los géneros ***Streptomyces*** (80.0%), ***Actinomices*** (10%), ***Nocardia***(6%) y ***Micromonospora*** (4%). Asimismo, Ramesh y Mathivana (2009), señalaron que de un total de 208 cepas de actinomicetos, 87.9% fueron identificados como ***Streptomyces*** y 12.1% pertenecían a otros géneros. Las cepas de actinomicetos identificadas por sus características

morfológicas macroscópicas y microscópicas, así como por su tolerancia a distintas concentraciones de sal se determinaron que pertenecen a otros géneros dentro de los que se encuentran ***Salinispora***, ***Verrucosipora*** y ***Micromonospora***.

Otras investigaciones como las realizadas por Torres ***et al.***, (2012) también encuentran que ***Streptomyces*** es el género predominante, representando el 70.6% de 235 cepas de actinomicetos aislados; asimismo, también identificaron a los géneros ***Micromonospora*** (11.1%) y ***Salinispora*** (17.8%); resultados que son coincidentes con los encontrados en el presente trabajo, a pesar de que las zonas de muestreo son diferentes y además probablemente se deba a que estas bacterias desarrollan mecanismos de osmoadaptación para compensar la alta presión osmótica del medio y a las estrategias que utilizan a través de la acumulación intracelular de altas concentraciones e iones inorgánicos como K⁺, Na⁺ y Cl⁻ (**Madigan *et al.*, 2003**).

Del total de actinomicetos aislados el 70.3% mostraron actividad antibacteriana frente a ***Staphylococcus aureus*** meticilino resistente; sin embargo León ***et al.***, (2007) de un total de 62 actinomicetos, el 50% mostraron actividad frente a ***S. aureus*** meticilino resistente; asimismo, Mancilla (2003) de un total de 62 actinomicetos, 31 cepas (50%) mostraron actividad frente a este patógeno. La actividad inhibitoria frente a esta Gram positiva puede deberse a que los metabolitos activos sintetizados por los actinomicetos aislados actúan a nivel del peptidoglucano de la pared celular de esta bacteria, desestabilizándola y posteriormente produciendo la lisis de la célula bacteriana.

El 72.9% (27 cepas) de los actinomicetos aislados mostraron actividad inhibitoria frente a ***Escherichia coli*** productor de betalactamasas de espectro extendido estos resultados difieren con lo reportado por Kokare ***et al.***, (2004) que de un total de 20 cepas bioactivas de actinomicetos marinos, 16 presentaron fuerte actividad frente a bacterias Grampositivos y solamente 2 de ellas (10%) frente a

Gramnegativas. Las bacterias gramnegativas poseen una membrana externa compuesta de lipopolisacaridos y fosfolipidos siendo una de sus principales funciones servir como barrera de permeabilidad (**Nikaido, 2003**). De esta forma como hubo inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* significa que las moléculas producidas por los actinomicetos aislados son capaces de permear la membrana externa. Estos compuestos antimicrobianos, que pasan por la membrana externa, pueden servir como desestabilizadores de la misma, ligándose a los componentes estructurales de la membrana, tornándola más permeable al punto de romperla. Otras moléculas pueden ultrapasar la membrana externa a través de porinas que son canales presentes en esta membrana actuando en el interior de la célula bacteriana (**Silva et al., 2012**).

En este mismo sentido, la multiresistencia antibiótica constituye un serio problema y gana cada vez más terreno en la farmacopea no solo en ambientes hospitalarios, sino también extrahospitalarios los cuales demandan nuevos antibióticos activos de amplio espectro (**Doernet et al., 1998**). Gracias a la participación de actinomicetos productores de metabolitos bioactivos tipo antibiótico es posible contrarrestar a algunos de los patógenos emergentes. Es así, que especies del género *Streptomyces ssp* de ambientes extremos, dejando entrever que nuestros resultados confirmamos la clasificación fenotípica de 24 cepas de *Streptomyces* los que han sido poco estudiados y son considerados actinomicetos modelos en la producción de nuevas y promisorias moléculas antimicrobianas.

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias salinas han demostrado ser altamente eficientes contra agentes patógenos que afectan a la salud humana (**Davies 2006, Surajit-Das et al., 2006**). Dos tercios de los antibióticos actualmente utilizados son los productos fermentativos de actinobacterias, como la estreptomicina, la tetraciclina, el cloranfenicol y la eritromicina, que son obtenidos a partir de diferentes especies terrestres del

género *Streptomyces* (**Challis y Hopwood 2003, Magarvey et al., 2004, Fenical y Jensen 2006**).

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos de la siguiente investigación se concluye lo siguiente:

- Se aislaron 37 cepas de actinomicetos de las Salinas de Mórrope de los cuales se identificaron como del género ***Streptomyces*** (64.9%), del género ***Nocardia*** (24.3%) y otros géneros (10.8%) no fueron identificadas.
- El 70.3% de actinomicetos aislados de las Salinas de Mórrope presentaron actividad antibacteriana frente a ***S. aureus*** meticilino resistente y el 72.9% frente a ***E. coli*** productor de Betalactamasas de espectro extendido.

VII. RECOMENDACIONES

Deseando que el presente trabajo, sirva como un aporte para futuras investigaciones, se recomienda lo siguiente:

- Investigar nuevas cepas de actinomicetos de diferentes ambientes salinos con actividad antimicrobiana.
- Realizar nuevas técnicas de cultivo para crecimiento de actinomicetos halófilos.
- Realizar la caracterización molecular o genotipificación de los actinomicetos con mejor actividad antimicrobiana.

VIII. RESUMEN

La presente investigación fue realizada con el objetivo de aislar, caracterizar y evaluar la actividad antibacteriana de actinomicetos de las Salinas de Mórrope-Lambayeque. Para esto se establecieron dos zonas de muestreo (zona A y zona B) que estuvo constituido por 14 muestras. Se llegó aislar 37 cepas de actinomicetos a las que se evaluó su actividad antibacteriana frente a dos patógenos ***S. aureus*** meticilino resistente y ***E. coli*** productor de betalactamasas de espectro extendido. El aislamiento se realizó en Agar Marino (AM), en el que predominaron las colonias circulares-blancas (29.7%) y circulares-cremas (24.3%), también se realizó la prueba de tolerancia a la sal (NaCl), clasificándolos en Halotolerantes y Halófilos débiles. De las 37 cepas de actinomicetos el 64.9% (24 cepas) pertenecieron al género ***Streptomyces***, el 10.8% (4 cepas) al género ***Nocardia*** y el 24.3% (9 cepas) pertenecieron a otros géneros. En tanto para las evaluaciones antibacterianas frente a los dos patógenos multidrogo-resistentes las cepas que presentaron mayor actividad antibacteriana frente a ***S. aureus*** meticilino resistente y ***E. coli*** BLEE fueron la cepa Morsa 05-01 con 40 y 36mm de halo de inhibición respectivamente, la segunda cepa con halo de inhibición representativo fue la cepa Morsa 11-03 con 34 mm de halo de inhibición para ambos patógenos; la cepa Morsa 03-05 mostró la actividad más baja para ***E. coli*** con halos de inhibición de 10 mm y la cepa con menor actividad frente a ambos patógenos fue la cepa Morsa 02-09 con 15 y 15.3 mm de diámetro respectivamente. Del presente estudio se concluye que el agua y sedimento de las salinas de Mórrope, son un importante reservorio de actinomicetos con actividad antibacteriana, constituyendo un gran potencial de importancia médica, farmacológica e industrial.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Angulo, L. y F. Graña. 1987.** Aislamiento e identificación de un *Streptomyces* marino con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de peces y moluscos aisladas a partir del medio marino y de aguas dulces. Thalassas 5, 97-101.
- Barcina, I., J.Iriberry y L. Egea. 1987.** Enumeration, isolation and some physiological properties of Actinomycetes from sea water and sediment. System. Appl. Microbiol. 10, 85-91.
- Barona, F. 2007.** Actinomycetes, Bacterias patógenas y productoras de antibióticos. México DF, 50 – 51 p.
- Benlloch S, López A, Casamayor E, Ovreas L, Goddard V, Daae F. 2002.** Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. Environ Microbiol; 4(6): 349-60.
- Berdi, J. 1989.** The discovery of the new bioactive microbial metabolites. Screening and identification. En M.E. Bushell y U. Gräfe (editores). Bioactive metabolites from microorganism. Progress in industrial microbiology. Vol. 27. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Brock, T; Smith, D; y Madigan, M; 1987.** Microbiología Prentice-Hall, Hispanoamérica S.A, México, 805 – 813 p.
- Cross, T. 1981.** Aquatic Actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol. 50, 397-423.

- Díaz Corrales, F., E. García y J. Serrano. 1997.** Identificación y producción de antibiosis por Actinomycetales aislados del suelo. Boletín SYM 17, 13-18.
- Engel, S., P. Jensen y W. Fenical. 2002.** Chemical ecology of marine microbial defense. J. Chem. Ecol., 28, 1971-1985.
- García, H y E. García. 2011.** Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev. Esp. Quimioter. 24(2):57-66.
- García, J. y J. Picazzo. 1996.** Microbiología Médica. Edit. Mosby/ Doyma Libros, S.A. España. 1262pp.
- Holt, J., N. Krieg., P. Sneath., J. Staley y S. Williams. 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology. 9ª edition. Williams y Wilkins, Baltimore. 787 p.
- Horan, A. C. 1994. En V. P. Gullo (editor).** Aerobic actinomycetes a continuing source of novel natural products. The discovery of Natural products with therapeutic potential. Butterworth-Heinemann, USA.
- Jensen, P. y W. Fenical. 1994.** Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. Ann. Rev. Microbiol. 48,559-584.
- Labeda, D.P. y Shearer. 1990.** En. D.P. Labeda. Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. Isolation of biotechnologic el organism from nature, McGraw hill, INC, 21-51.
- Lazzarini, A; Cavaletti, L; Toppo, G, Marinelli, F; 2000.** Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Ant van Leeuwenhoek. 399 – 405p.

- Leiva, S., H. García-Quintana y L. Zaror. 2000.** Actinomycetes acuáticos: una revisión sobre su aislamiento, distribución y potencial antibiótico. Medio Ambiente., 13, 80-88.
- Leiva, S; Yañez, M; Zarror L, Rodríguez, H; García, H; 2004.** Actividad Microbiana de Actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del Sur de Chile. Revista Médica, Santiago, Chile. 132: 151 – 159 p.
- León J., L. Liza., I. Soto y R. Zerpa. 2007.** Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. Rev. Per. Biol. 14(2): 259-70.
- León, J., J. Aponte., R. Rojas y M. Guerrero. 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. Rev. Per. Med. Exp. Salud Pública. 28(2):237-46.
- Leveau, J & Bouix, M; 2000.** Microbiología Industrial, Los microorganismos de interés industrial. Primera Edición. Editorial Acribia, España. 419 – 420 p.
- Mancilla, C. 2003.** Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la Microbiota bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia. Tesis para optar el grado de Licenciado en ciencias biológicas. Universidad Austral de Chile.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003.** Crecimiento microbiano. En: Biología de los microorganismos 10ma edición Prentice may; pp. 137-160.
- Morell, J. 1998.** Infecciones por Estafilococos. Rev. Medicine 7(78):45 05-08.

- Nolan, R. y T. Cross.1988.** Isolation and screening of actinomycete in Good fellow M, Williams ST, Mordarsky M, ed. Actinomycetes en biotechnology. San Diego, Calif.: AcademicPress Inc.: 1-32.
- Phillips, L; 1993.** Seminario sobre Actinomicetes, Versión traducida, Xenova, Ecuador. 1 - 2 : 18 - 19 p.
- Pisano, M., M. Sommer y L. Taras.1992.** Bioctivity of chitinolyticaactinomycetes of marine origin. Appl. Microbiol. Biotechnology, 36, 553-555.
- Remya, M. y R. Vijayakumar.2008.** Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. Medicine and Biology. 15(1):13-18.
- Rheinheimer, G. 1987.** Microbiología de las aguas. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Ryan K. y Ray G. 2005.** Microbiología Médica una introducción a enfermedades infecciosas. Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A. Madrid – España. 1059p.
- Saadoun, I., K. Hameed y A. Moussauui. 1999.** Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. Microbios 99, 173-179.
- Sánchez-Porro C, Martín S, Mellado E, Ventosa A. 2003.**Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J ApplMicrobiol 94(2): 295-300.
- Selman A. Waksman.** Actinomyces antibioticus a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria and h. boyd woodruff new jersey

agricultural experiment station, new brunswick, n. j. received for publication, january 15, 194.

Suarez, F; 2008. Evaluación e identificación de géneros de actinomycetes aislados a partir de suelo rizosférico no cultivado de trébol blanco (*Trifolium repens*) como promotores de crecimiento vegetal. Vol.13. Bogota – Colombia. 88 – 90 p.

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

Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 62(2): 504-44.

Vinueza, G; 2010. Determinación de la relación entre las características fenotípicas y genotípicas de actinomicetes como mecanismo dereplicación de microorganismos útiles en biotecnología. Ambato 46 - 51 p.

Waksman S. A, Lechevalier H. A. 1949. Neomycin, a new Antibiotic Active against Streptomycin- Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms Science. 25; 109(2830):305–307.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Composición g/L del Agar Marino Modificado

COMPOSICIÓN	
Glucosa	10.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Agar Agar	20.0 gr
Agua salina	50 ml
Agua destilada	950 ml
pH	7.0
Fluconazol	1 %

Tabla 2. Composición g/L del Caldo Sales Doble Concentrado

COMPOSICIÓN	
Glucosa	20.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua salina	50 ml
Agua destilada	950 ml
pH	7.0
Cloranfenicol	1%
Fluconazol	1%

ANEXO 3

Cuadro 1. Clasificación de microorganismos de acuerdo a su crecimiento concentración de NaCl Ramírez *et al.*, 2006.

Halófilos	Concentración de NaCl
Halófilos Extremos	Arriba de 20%
Halófilos moderados	Arriba del 10-20%
Halófilos débiles	Arriba del 0,5-10%
Halotolerantes	Toleran la salinidad

Tabla 3. Lectura de sensibilidad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente Manual INS 2002.

Antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro en mm		
		R	I	S
Oxacilina	1 ug	≤10	11-12	≥13

Tabla 4. Zonas de inhibición para detectar posibles BLEE en *Escherichia coli* (CLSI).

Antibiótico	Cepas sensibles	Posible producción de BLEE
Aztreonam	≥ 22mm	≤ 27mm
Cefotaxima	≥ 23mm	≤ 27mm
Ceftriaxona	≥ 21mm	≤ 25mm
Ceftazidima	≥ 18mm	≤ 22 mm

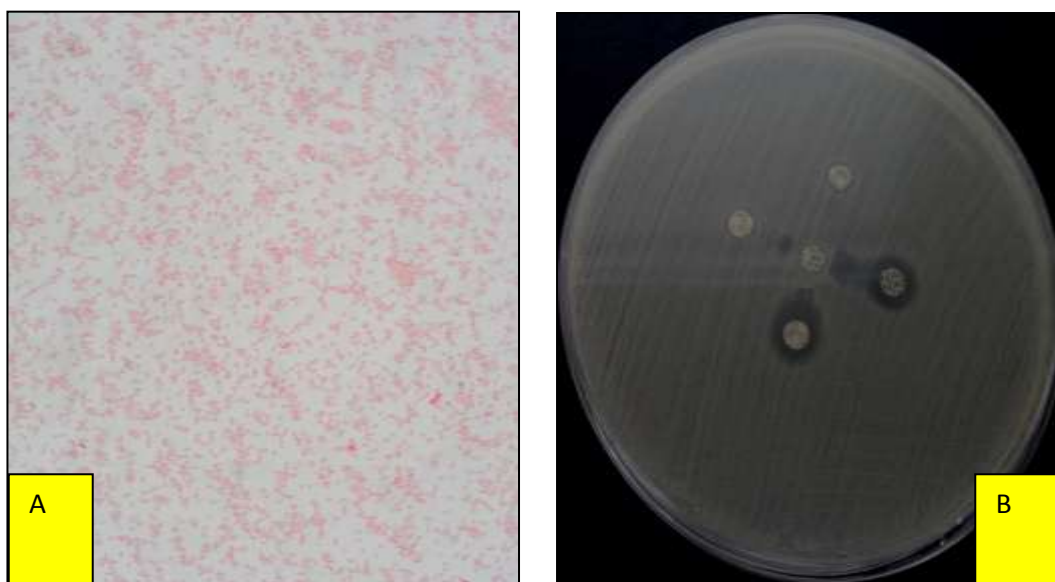


Figura 2.A. Tinción Gram 100X. **B.** Método de Jarlier Sociedad Francesa (CLSI) para confirmar BLEE.

Tabla N° 5. Presencia del gen CTX-M en muestras de Urocultivo según sexo, edad y área de ingreso del HRL Nov 2012-Jul 2013

N° Registro	Sexo	Edad	Presencia del gen	Área de Ingreso paciente CTX-M
63	M	72	No	NEFROLOGÍA
72	F	39	No	GINECOLOGIA
77	F	21	No	GINECOLOGÍA
86	F	74	Si	CIRUGÍA
111	F	36	No	TRAUMATOLOGÍA
113	F	64	Si	GERIATRIA
118	F	46	No	EMERGENCIA
125	F	89	No	EMERGENCIA
134	M	84	No	NEFROLOGÍA
144	F	10 meses	No	PEDITARIA
146	M	84	No	NEFROLOGÍA
148	F	7 meses	Si	EMERGENCIA
155	M	77	Si	NEFROLOGÍA
166	F	19	No	PSIQUIATRA
197	F	50	No	GINECOLOGÍA
216	F	55	Si	MEDICINA INTERNA
217	F	52	Si	NEFROLOGIA
240	F	48	No	GINECOLOGÍA
340	M	23	Si	EMERGENCIA
343	F	61	Si	MEDICINA INTERNA
349	M	54	No	UROLOGÍA
409	F	29	Si	UROLOGÍA
431	F	18	Si	GINECOLOGIA
454	F	29	Si	EMERGENCIA
1704	F	54	Si	EMERGENCIA
1802	F	55	Si	CARDIOLOGÍA
1805	F	14	Si	EMERGENCIA
1814	F	34	Si	GINECOLOGIA
1818	M	57	Si	UROLOGÍA
1897	M	85	No	UROLOGÍA
1905	M	76	No	EMERGENCIA
1971	F	24	Si	NEFROLOGÍA
1997	F	82	No	GINECOLOGÍA
2019	M	81	No	EMERGENCIA
2025	M	18	Si	UROLOGIA

Tabla N° 6. Lectura de los halos de Inhibición de los 35 Pacientes Blee H.R.L En los meses Novi
2013-Julio 2013.






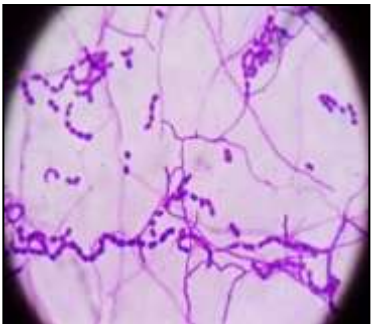
ANTIB	(CRO)	(ATM)	(CTX)	(AMC)	(CXM)
N° REGISTRO					
63	6	15	6	8	6
72	17	18	6	6	6
77	13	27	14	6	6
86	36	17	11	8	6
111	6	6	6	6	6
113	21	27	23	6	6
118	12	23	15	6	6
125	17	17	17	17	17
134	17	18	17	17	18
144	15	25	17	6	16
146	11	16	12	7	6
148	7	18	9	6	6
155	10	17	6	6	6
166	7	15	11	6	6
197	8	16	11	8	6
216	8	16	17	6	6
217	14	23	17	10	23
240	8	10	8	6	6
340	10	12	12	11	6
343	8	6	6	6	19
349	16	6	6	12	10
409	8	16	8	11	6
431	6	19	11	6	6
454	21	12	18	17	21
1704	8	16	8	13	6
1802	13	17	21	16	23
1805	10	31	11	15	6
1814	14	14	23	22	23
1818	8	10	8	16	6
1897	17	13	12	18	14
1905	6	6	6	6	12
1971	6	20	10	6	6
1997	6	6	6	6	12
2019	6	14	6	8	6
2025	6	6	6	8	6

CRO= Ceftriaxona ATM= Aztreonam/Monobactam CTX= Cefotaxima AMC= Amoxicilina+ Ac. Clavulámico CXM= Cefuroxima.

Tabla N°7.Presencia del gen CTX-M en muestras de Urocultivo según sexo, edad y área de ingreso del HRL. Nov 2012-Julio 2013

N° Registro Sexo		Edad	Presencia del gen <i>bla</i> CTX-M	Área de Ingreso paciente
63	M	72	No	NEFROLOGÍA
72	F	39	No	GINECOLOGIA
77	F	21	No	GINECOLOGÍA
86	F	74	Si	CIRUGÍA
111	F	36	No	TRAUMATOLOGÍA
113	F	64	Si	GERIATRIA
118	F	46	No	EMERGENCIA
125	F	89	No	EMERGENCIA
134	M	84	No	NEFROLOGÍA
144	F	10 meses	No	PEDITARIA
146	M	84	No	NEFROLOGÍA
148	F	7 meses	Si	EMERGENCIA
155	M	77	Si	NEFROLOGÍA
166	F	19	No	PSIQUIATRA
197	F	50	No	GINECOLOGÍA
216	F	55	Si	MEDICINA INTERNA
217	F	52	Si	NEFROLOGIA
240	F	48	No	GINECOLOGÍA
340	M	23	Si	EMERGENCIA
343	F	61	Si	MEDICINA INTERNA
349	M	54	No	UROLOGÍA
409	F	29	Si	UROLOGÍA
431	F	18	Si	GINECOLOGIA
454	F	29	Si	EMERGENCIA
1704	F	54	Si	EMERGENCIA
1802	F	55	Si	CARDIOLOGÍA
1805	F	14	Si	EMERGENCIA
1814	F	34	Si	GINECOLOGIA
1818	M	57	Si	UROLOGÍA
1897	M	85	No	UROLOGÍA
1905	M	76	No	EMERGENCIA
1971	F	24	Si	NEFROLOGÍA
1997	F	82	No	GINECOLOGÍA
2019	M	81	No	EMERGENCIA
2025	M	18	Si	UROLOGIA

Descripción morfológica y observación microscópica de las 37 colonias de actinomicetos de las Salinas de Mórrope

<i>Código</i>	<i>Colonia</i>	<i>Descripción de colonia</i>	<i>Morfología microscópica</i>
<i>Morsa</i> <i>01-01</i>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: Filamentosa</i> <i>Consistencia: Seca</i> <i>Elevación: Acuminada</i> <i>Color de filamento aéreo: Blanco</i> <i>Color de filamento de sustrato: crema</i> <i>Tamaño: 1 mm</i></p>	
<i>Morsa</i> <i>01-02</i>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: ondulado</i> <i>Consistencia: seca.</i> <i>Elevación: Crateriforme</i> <i>Color de filamento aéreo: crema</i> <i>Color de filamento de sustrato: amarillo</i> <i>Tamaño: 2 mm</i></p>	
<i>Morsa</i> <i>01-03</i>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: Filamentosa</i> <i>Consistencia: Seca</i> <i>Elevación: Acuminada.</i> <i>Color de filamento aéreo: crema</i> <i>Color de filamento de sustrato: gris</i> <i>Tamaño: 2,5 mm</i></p>	

Morsa
01-04



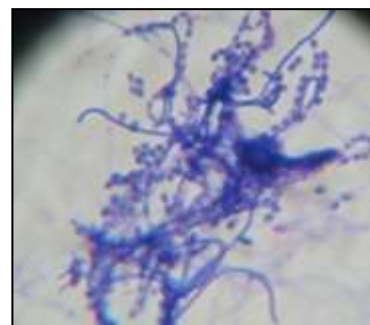
Forma: Circular
Borde: Filamentosa
Consistencia: Seca
Elevación: Acuminada
Color de filamento aéreo: crema
Color de filamento de sustrato: amarillo
Tamaño: 2,0 mm



Morsa
01-05



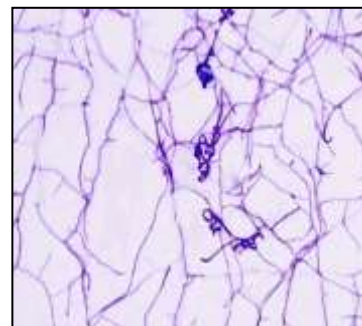
Forma: Circular
Borde: Filamentosa
Consistencia: seca
Elevación: Acuminada
Color de filamento aéreo: blanco-grisáceo
Color de filamento de sustrato: amarillo
Tamaño: 1,5 mm



Morsa
02-03



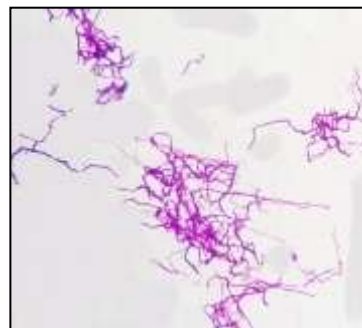
Forma: Circular
Borde: Filamentosa
Consistencia: yesosa
Elevación: Elevada
Color de filamento aéreo: blanco
Color de filamento de sustrato= amarillo claro
Tamaño: 1 mm


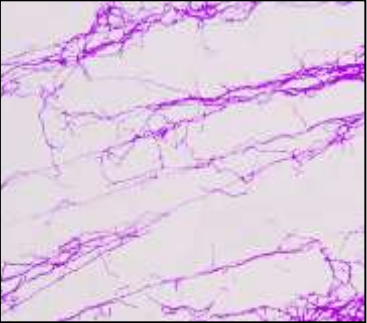

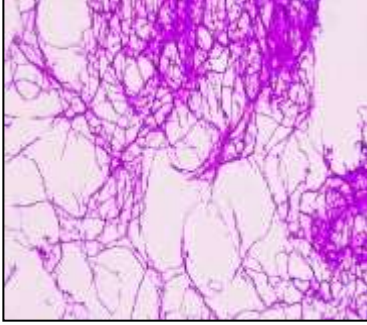

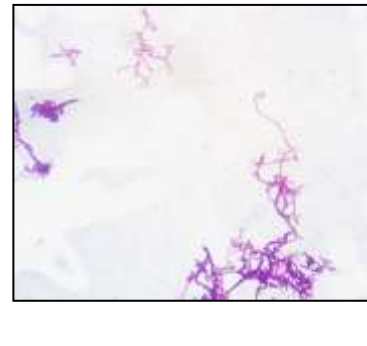

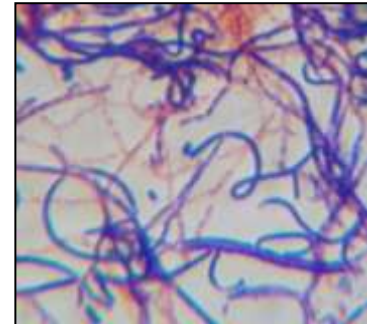



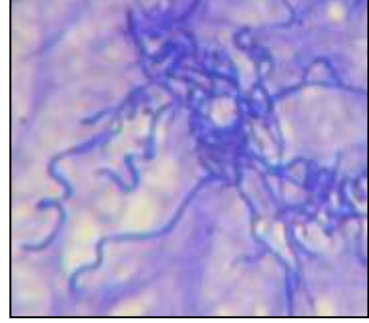

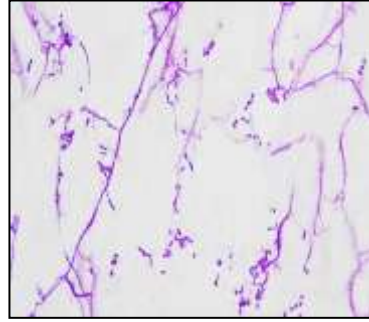
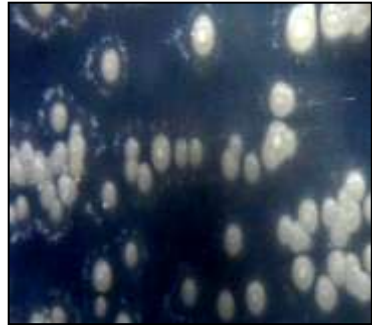
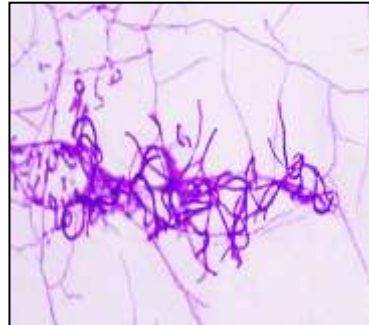
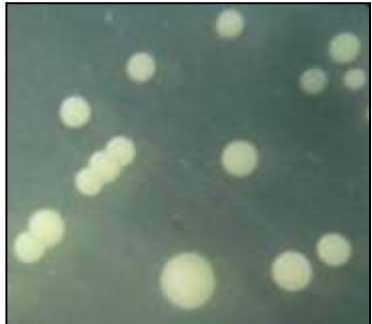

Morsa
02-09


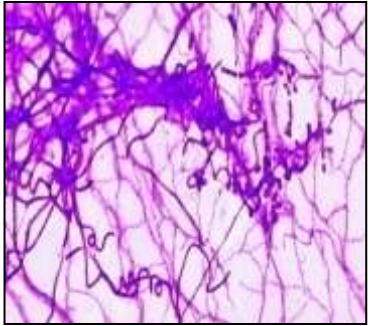
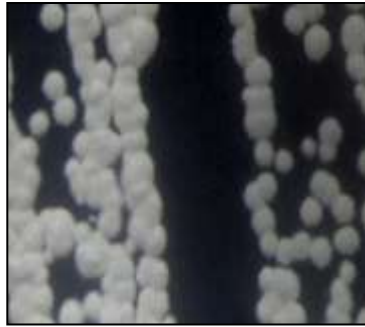
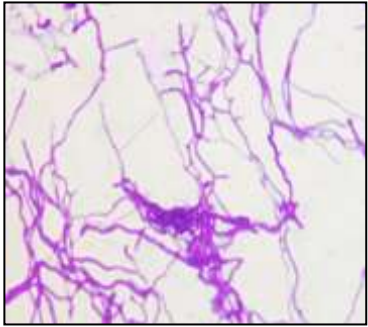

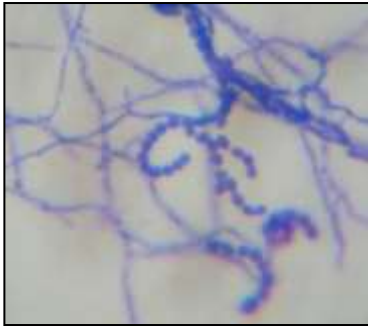




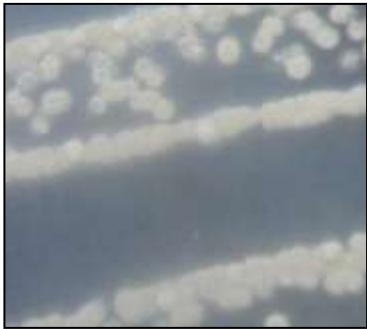
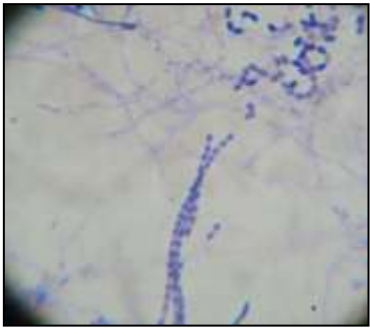

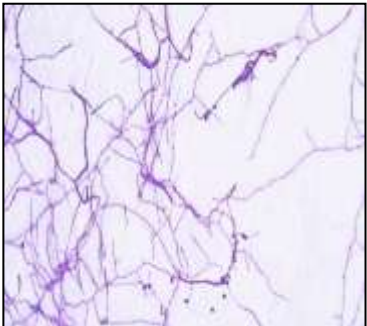

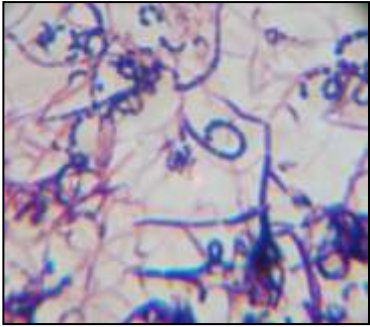

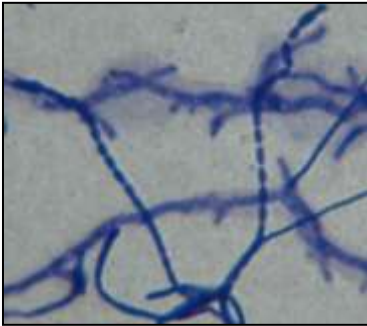
Forma: estrellada
Borde: Lobulada
Consistencia: Seca
Elevación: crateriforme
Color de filamento aéreo: amarillo
Color de filamento de sustrato: amarillo
Tamaño: 3,0 mm



<p>Morsa 03-03</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: Irregular</i> <i>Consistencia: Seca</i> <i>Elevación: crateriforme</i> <i>Color de filamento aéreo: blanco</i> <i>Color de filamento de sustrato: Crema</i> <i>Tamaño: 5,0 mm</i></p>	
<p>Morsa 03-04</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: filamentosa</i> <i>consistencia: yesosa</i> <i>Elevación: elevada</i> <i>Color de filamento aéreo: blanco</i> <i>Color de filamento de sustrato: gris</i> <i>Tamaño: 2,0 mm</i></p>	
<p>Morsa 03-05</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: filamentosa</i> <i>Consistencia: yesosa.</i> <i>Elevación: elevada</i> <i>Color de filamento aéreo: blanco</i> <i>Color de filamento de sustrato: amarillo claro</i> <i>Tamaño: 3,0</i></p>	
<p>Morsa 03-06</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: entero</i> <i>Consistencia: seca</i> <i>Elevación: convexa</i> <i>Color de filamento aéreo: blanco</i> <i>Color de filamento de sustrato: blanco</i> <i>Tamaño: 2.0 mm</i></p>	

<p>Morsa 03-07</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: filamentoso</i> <i>Superficie: yesosa</i> <i>Elevación: elevada</i> <i>Color de filamento aéreo: pardo</i> <i>Color de filamento de sustrato: crema</i> <i>Tamaño: 1,0 mm</i></p>	
<p>Morsa 04-01</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: filamentosa</i> <i>Consistencia: seca</i> <i>Elevación: semi-elevada</i> <i>Color de filamento aéreo: amarillo</i> <i>Color de filamento de sustrato: gris</i> <i>Tamaño: 0,5 mm</i></p>	
<p>Morsa 04-02</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: filamentoso</i> <i>Consistencia: seca</i> <i>Elevación: elevada</i> <i>Color de filamento aéreo: crema</i> <i>Color de filamento de sustrato: amarillo claro</i> <i>Tamaño: 0,5 mm</i></p>	
<p>Morsa 04-03</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: entero</i> <i>Consistencia: seca</i> <i>Elevación: convexa</i> <i>Color de filamento aéreo: amarillo</i> <i>Color de filamento de sustrato: amarillo</i> <i>Tamaño: 1,5 mm</i></p>	

Morsa 05-01		<p>Forma: Circular Borde: filamentoso Consistencia: yesosa Elevación: elevada-convexa Color de filamento aéreo: gris Color de filamento de sustrato: gris Tamaño: 1,0 mm</p>	
Morsa 05-02		<p>Forma: Circular Borde: entero Consistencia: yesosa Elevación: elevada-convexa Color de filamento aéreo: blanco Color de filamento de sustrato: crema Tamaño: 0,3 mm</p>	
Morsa 07-01		<p>Forma: Circular Borde: filamentosa Consistència: filamentosa Elevación: convexa Color de filamento aéreo: pardo Color de filamento de sustrato: crema Tamaño: 1,5 mm</p>	
Morsa 07-02		<p>Forma: Circular Borde: filamentoso Consistència: seca Elevación: convexa Color de filamento aéreo: blanco Color de filamento de sustrato: crema Tamaño: 1,5 mm</p>	

<p>Morsa 07-03</p>		<p> <i>Forma: Circular</i> <i>Borde: entero</i> <i>Consistencia: yesosa</i> <i>Elevación: elevada</i> <i>Color de filamento aéreo: pardo</i> <i>Color de filamento de sustrato: crema</i> <i>Tamaño: 1,0 mm</i> </p>	
<p>Morsa 08-02</p>		<p> <i>Forma: Circular</i> <i>Borde: filamentosa</i> <i>Superficie: yesosa</i> <i>Elevación: elevada-convexa</i> <i>Color de filamento aéreo: crema</i> <i>Color de filamento de sustrato: crema</i> <i>Tamaño: 1,0 mm</i> </p>	
<p>Morsa 08-03</p>		<p> <i>Forma: Circular</i> <i>Borde: entero</i> <i>Superficie: yesosa</i> <i>Elevación: elevada</i> <i>Color de filamento aéreo: parda</i> <i>Color de filamento de sustrato: crema</i> <i>Tamaño: 1,0 mm</i> </p>	
<p>Morsa 08-04</p>		<p> <i>Forma: Circular</i> <i>Borde: filamentosa</i> <i>Consistência: filamentosa</i> <i>Elevación: acuminada</i> <i>Color de filamento aéreo: gris</i> <i>Color de filamento de sustrato: gris</i> <i>Tamaño: 1,0 mm</i> </p>	

Morsa
09-01



Forma: irregular
Borde: irregular
Consistencia: seca
Elevación: elevada
Color de filamento aéreo: crema
Color de filamento de sustrato: crema
Tamaño: 1,5- 2 mm



Morsa
10-01



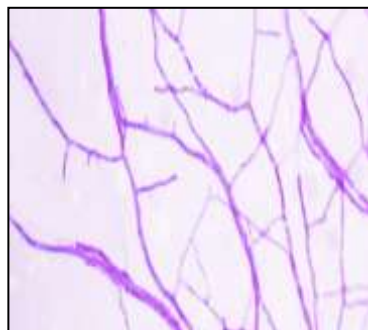
Forma: irregular
Borde: irregular
Consistencia: seca
Elevación: elevada
Color de filamento aéreo: crema
Color de filamento de sustrato: crema
Tamaño: 1,5 mm



Morsa
11-01



Forma: Circular
Borde: filamentosa
Consistencia: seca
Elevación: acuminada
Color de filamento aéreo: pardo
Color de filamento de sustrato: blanca
Tamaño: 3,0 mm


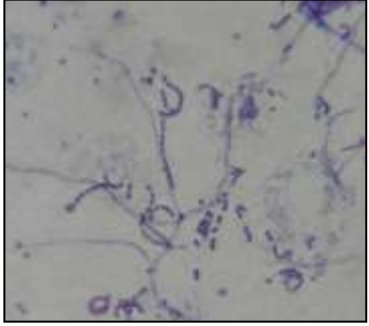

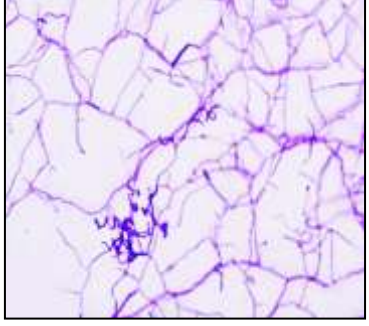

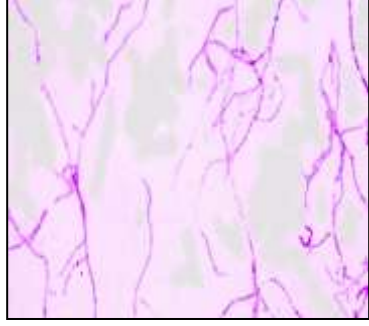




Morsa
11-02



Forma: Circular
Borde: Lobulado
Consistencia: seca
Elevación: Elevada
Color de filamento aéreo: crema
Color de filamento de sustrato: amarillo claro
Tamaño: 4,0 mm



<p>Morsa 11-03</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: filamentoso</i> <i>Consistència: seca</i> <i>Elevación: acuminada</i> <i>Color de filamento aéreo: blanco</i> <i>Color de filamento de sustrato: blanco</i> <i>Tamaño: 1,5 mm</i></p>	
<p>Morsa 12-01</p>		<p><i>Forma: Circular</i> <i>Borde: Filamentosa</i> <i>Consistencia: seca</i> <i>Elevación: acuminada</i> <i>Color de filamento aéreo: crema</i> <i>Color de filamento de sustrato: amarillo claro</i> <i>Tamaño: 1,0 mm</i></p>	
<p>Morsa 12-03</p>		<p><i>Forma: Crateriforme</i> <i>Borde: lobulado- blanco</i> <i>Consistencia: seca</i> <i>Elevación: acuminada</i> <i>Color de filamento aéreo: pardo</i> <i>Color de filamento de sustrato: pardo</i> <i>Tamaño: 2,0 mm</i></p>	
<p>Morsa 12-04</p>		<p><i>Forma: circular</i> <i>Borde: ondulado</i> <i>Consistencia : seca</i> <i>Elevación: crateriforme</i> <i>Color de filamento aéreo: amarillo</i> <i>Color de filamento de sustrato: amarillo</i> <i>Tamaño: 1,5 mm</i></p>	

Morsa
13-02



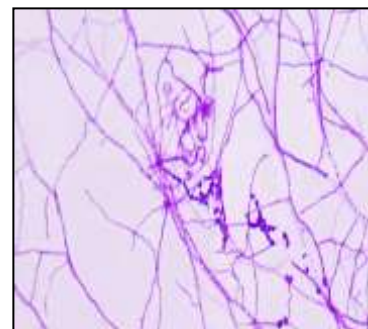
Forma: circular
Borde: irregular
Consistencia: seca
Elevación: crateriforme
Color de filamento aéreo: crema
Color de filamento de sustrato: crema
Tamaño: 3,0 mm



Morsa
13-05



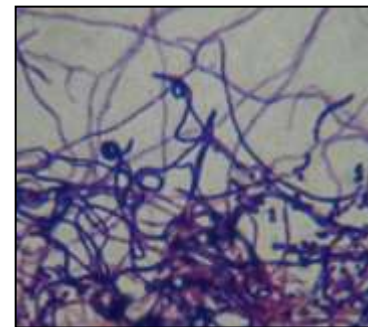
Forma: circular
Borde: filamentoso
Consistencia: seca
Elevación: acuminada
Color de filamento aéreo: gris
Color de filamento de sustrato: amarillo
Tamaño: 2,0 mm



Morsa
13-06



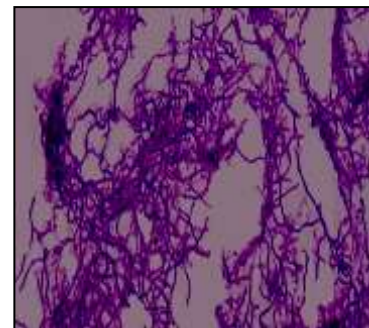
Forma: filamentososa
Borde: filamentoso
Consistencia: filamentososa
Elevación: acuminada
Color de filamento aéreo: gris
Color de filamento de sustrato: gris
Tamaño: 1,0 mm



Morsa
14-01



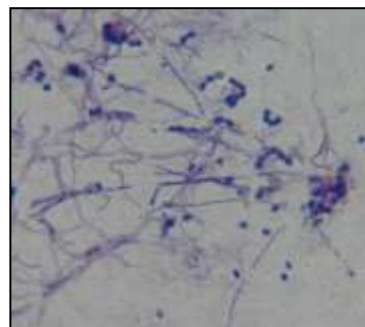
Forma: circular
Borde: ondulado
Consistència: seca
Elevación: acuminada
Color de filamento aéreo: crema
Color de filamento de sustrato: amarillo claro
Tamaño: 6,5 mm



Morsa
14-02



Forma: circular
Borde: filamentosos
Consistência: seca
Elevación: crateriforme
Color de filamento aéreo: blanco
Color de filamento de sustrato: blanco
Tamaño: 1.5 mm



Morsa
14-03



Forma: circular
Borde: filamentosos
Consistência: seca
Elevación: acuminada
Color de filamento aéreo: blanco
Color de filamento de sustrato: blanco
Tamaño: 1-1.5 mm

