



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

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

"AÑO DEL DIÁLOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL"

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
ACTINOMICETOS DE SEDIMENTOS ACUOSOS DE LA LAGUNA MORÓN
DE LA PROVINCIA DE PISCO – ICA**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

Bach. OLAGUIBEL VERGARA, FLOR NEPTALI

Bach. TELLO MEZA, EDITH MAGALY

Bach. VELASQUEZ LLACHUARIMAY, SUSAN JUDITH

2018

DEDICATORIA

A Dios:

Por darnos siempre las fuerzas para continuar en momentos de pruebas, por guiarnos en el sendero de lo sensato y darnos sabiduría en las situaciones difíciles para cumplir nuestros sueños.

A nuestros padres:

Por su sacrificio, fortaleza, amor, compañía y confianza incondicional que nos brindaron durante este largo proceso para lograr ser un profesional. Por siempre ser los mejores amigos y maestros de nuestra vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de forma especial a la Dra. Haydeé Chávez, Dr. Felipe Surco, a la Dra. Carmen Huayanca y al Dr. Mblgo. Juan José Guillermo Alvitres, por su paciencia, motivación, orientación y enseñarnos que sólo con esfuerzo y dedicación podremos lograr nuestros objetivos. Por su disponibilidad y apoyo durante el proceso de elaboración de la presente tesis.

Asimismo, agradecemos a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, por nuestra formación profesional y darnos la oportunidad de ser profesionales.

Finalmente, agradecemos a la Asociación Científica de Investigación Farmacéutica – ACIF, nuestro sincero y profundo agradecimiento. Fueron cinco años de aprendizaje e incentivo a la investigación.

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	<i>VI</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>VII</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>VIII</i>
<i>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	<i>10</i>
<i>1.1 Descripción de la realidad problemática</i>	<i>10</i>
<i>1.2 Formulación del problema</i>	<i>11</i>
<i>1.3 Justificación e importancia</i>	<i>11</i>
<i>1.4 Objetivos de la investigación</i>	<i>12</i>
<i>1.5 Hipótesis y variables</i>	<i>12</i>
<i>2. BASES TEÓRICAS</i>	<i>13</i>
<i>2.1 Antecedentes</i>	<i>13</i>
<i>2.1.1 Antecedente Internacionales</i>	<i>13</i>
<i>2.1.2 Antecedente Nacionales</i>	<i>14</i>
<i>2.2 Marco teórico</i>	<i>15</i>
<i>2.2.1 Actinomicetos</i>	<i>15</i>
<i>2.2.1.1 Clasificación Taxonómica</i>	<i>16</i>
<i>2.2.1.2 Composición Química</i>	<i>22</i>
<i>2.2.1.3 Importancia de los actinomicetos</i>	<i>23</i>
<i>2.2.1.4 Hábitat</i>	<i>25</i>
<i>2.2.2 Antibióticos</i>	<i>25</i>
<i>2.2.3 Actividad Antibacteriana</i>	<i>30</i>
<i>2.2.3.1 Microorganismos – bacterias</i>	<i>30</i>
<i>2.2.3.2 Cepas utilizadas en estudio</i>	<i>31</i>
<i>2.2.3.2.1 Cepas bacterianas Gram – negativas</i>	<i>31</i>
<i>2.2.3.2.2 Cepas bacterianas Gram – positivas</i>	<i>33</i>
<i>2.2.4 Análisis fisicoquímicos del agua</i>	<i>35</i>
<i>2.2.4.1 Parámetros fisicoquímicos del agua</i>	<i>35</i>

3. METODOLOGÍA.....	38
3.1 Materiales.....	38
3.2 Localización geográfica.....	41
3.3 Muestreo.....	42
3.4 Procesamiento de la muestra y aislamiento de actinomicetos.....	42
3.5 Caracterización de cultivos de actinomicetos.....	43
3.6 Evaluación de la actividad antibacteriana.....	45
3.6.1 Cepas indicadoras.....	45
3.6.2 Actividad antibacteriana.....	46
3.6.3 Materiales y procesos previos a la evaluación.....	46
3.6.4 Método de difusión en disco.....	48
3.6.5 Método del enfrentamiento dual.....	50
3.7 Análisis del agua.....	51
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Localización geográfica de puntos de muestreo.....	53
4.2 Aislamiento y caracterización de los actinomicetos.....	54
4.2.1 Identificación Macroscópica.....	54
4.2.2 Identificación Microscópica.....	57
4.3 Evaluación de la actividad antibacteriana.....	61
4.4 Análisis fisicoquímico del agua.....	63
5. DISCUSIÓN.....	65
6. CONCLUSIONES.....	67
7. RECOMENDACIONES.....	68
Referencias bibliográficas.....	69
Anexos.....	79

RESUMEN

La resistencia a antimicrobianos constituye un problema de gran impacto en la salud pública mundial, generando un incremento continuo de fracasos en la terapia antimicrobiana debido al aumento y diversidad de microorganismos resistentes. Estamos viviendo un momento en la historia en donde infecciones comunes y lesiones menores pueden ser potencialmente mortales. Por lo tanto, es imperativo buscar nuevos antimicrobianos, más eficientes y de mayor espectro y tolerancia para combatirlos. Los actinomicetos de ambientes acuáticos constituyen una de las fuentes más atractivas de antibióticos y sustancias biológicas de alto interés; debido a las capacidades metabólicas y fisiológicas que son diferentes a los de sus contrapartes terrestres.

*En este trabajo de investigación se evaluó la actividad antibacteriana de actinomicetos aislados a partir de sedimentos acuáticos de la laguna Morón, ubicado en el distrito de Bernalles, Provincia de Pisco - Ica. Los actinomicetos se aislaron a partir de sedimentos acuáticos, utilizando Agar Caseína- Almidón suplementado con nistatina (25 µg/mL) como agente antifúngico. Se obtuvieron 26 posibles cepas de actinomicetos; a los cuales se les realizó su identificación macroscópica y microscópica, teniendo como resultado 9 cepas de actinomicetos. Se realizaron dos pruebas antimicrobianas, el método de difusión en disco y el método de enfrentamiento dual, frente a cepas patógenas de origen clínico; mostrando mínima efectividad inhibitoria contra las cepas UNSLG P₁ 10⁴ identificada como *Streptomyces* sp. y la UNSLG P₂ 10⁴ identificada como *Nocardia* sp. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se concluye que los actinomicetos aislados del sedimento acuático de la laguna Morón no tienen gran capacidad antibacteriana frente a las cepas patógenas de origen clínico.*

Palabras Clave: *Sedimento acuático, actinomicetos, actividad antibacteriana, cepas patógenas.*

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a problem of great impact on world public health, generating a continuous increase in failures in antimicrobial therapy due to the increase and diversity of resistant microorganisms. We are living a moment in history where common infections and minor injuries can be life threatening. Therefore, it is imperative to look for new antimicrobials, more efficient and with greater spectrum and tolerance to combat them. The actinomycetes of aquatic environments constitute one of the most attractive sources of antibiotics and biological substances of high interest; due to the metabolic and physiological capacities that are different from those of their terrestrial counterparts.

*In this research work we evaluated the antibacterial activity of actinomycetes isolated from aqueous sediments of the Moron lagoon, located in the district of Bernalles, Province of Pisco - Ica. The actinomycetes were investigated from aqueous sediments, using Casein-Starch Agar supplemented with nystatin (25 µg / mL) as an antifungal agent. 29 possible strains of actinomycetes were isolated, to which their macroscopic and microscopic identification was made, resulting in 9 strains of actinomycetes. Two antimicrobial tests were performed, the disk diffusion method and the dual confrontation method, against pathogenic strains of clinical origin; showing highly effective inhibitory strains UNSLG P₁ 10⁴ identified as *Streptomyces* sp. and the UNSLG P₂ 10⁴ identified as *Nocardia* sp. against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. It is concluded that the actinomycetes isolated from the aqueous sediment of the Moron lagoon do not have a great antibacterial capacity against the pathogenic strains of clinical origin.*

Keywords: *Aqueous sediment, actinomycetes, antibacterial activity, pathogenic strains.*

INTRODUCCIÓN

La medicina actual se desarrolla en medio de una crisis global de resistencia a los antimicrobianos, descrita para patógenos tanto en el ambiente hospitalario como ambulatorio. Las enfermedades infecciosas siguen siendo la segunda causa de muerte en todo el mundo¹. En el año 2012 el Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias CNSP a través del instituto nacional de salud (INS) publicó el “Informe de la Resistencia Antimicrobiana en Bacterias de Origen Hospitalario” en la que señala los agentes infecciosos más importantes son el Staphylococcus aureus, Staphylococcus coagulasa negativo, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus, Enterobacter, Escherichia coli, Candida albicans, Klebsiella y otros².

Las consecuencias de estas infecciones son fallas en la respuesta al tratamiento (enfermedad prolongada y mayor riesgo de muerte), periodos más largos de infectividad y rotación a drogas de segunda o tercera línea que son más caras y más tóxicas. Así mismo señala los porcentajes de resistencia más altos en Staphylococcus aureus para penicilina de 99%; es también preocupante el perfil de resistencia de Pseudomonas aeruginosa ya que sobrepasa el 30% para todas las familias de antimicrobianos en vigilancia. En Klebsiella pneumoniae y Escherichia coli la resistencia a cefalosporinas de tercera generación supera el 50%. En enterobacterias, como problema principal es la resistencia antimicrobiana a los antibióticos betalactámicos, muchos de ellos son productores de beta lactamasa de espectro extendido².

Es indiscutible que los nuevos medicamentos, principalmente los antibióticos, se necesitan con urgencia para detener y revertir la propagación implacable de los agentes patógenos resistentes a los antibióticos³; ya que hoy en día, las nuevas cepas resistentes aparecen con mayor rapidez, mientras que la tasa de descubrimiento de nuevos antibióticos ha disminuido notoriamente⁴. Para superar esta situación, existe

un interés por mejorar o descubrir nuevos antibióticos en todo el mundo de la clase que tienen diferentes mecanismos de acción⁵. La mayoría de los antibióticos disponibles en el mercado se obtienen directamente de microorganismos y dentro de ellos destacan los hongos filamentosos y los Actinomicetos⁶.

Los Actinomicetos son bacterias filamentosas Gram positivas, que tienen un alto contenido de G+C (> 55%) en su ADN, abundantes en suelos y plantas, pero también encontradas en ambientes acuáticos dulceacuícolas y marinos⁷; son una de las fuentes más atractivas de antibióticos y otras sustancias biológicas de alto valor comercial, como vitaminas, alcaloides, factores de crecimiento de plantas, enzimas e inhibidores de enzimas; se han encontrado que las dos terceras partes de antibióticos, incluyendo algunos de importancia agrícola, provienen de Actinomicetos⁸.

Los microorganismos acuáticos son particularmente atractivos ya que no han sido tan extensamente explotados⁹ y es por ello que se espera que las capacidades metabólicas y fisiológicas de los microorganismos acuáticos sean diferentes a las de sus contrapartes terrestres, lo que ofrece un enorme potencial de descubrimiento de nuevas drogas. Esto podría determinar que los Actinomicetos en su proceso de adaptación al ambiente acuático, hayan desarrollado habilidades estratégicas que les otorguen mayores probabilidades de supervivencia, entre las cuales la producción de metabolitos bioactivos en contra de otras bacterias, hongos y otros organismos¹⁰.

En los últimos años ha habido una creciente toma de conciencia del valor potencial de los hábitats de agua dulce como fuente de Actinomicetos que producen metabolitos secundarios de importancia clínica¹¹.

Esta investigación pretende contribuir en la lucha contra las enfermedades infecciosas causadas por los agentes patógenos de origen bacteriano que aquejan a la población mundial y que por años han cobrado la vida de millones de personas de todas las edades principalmente en los países en vías de desarrollo; en tal razón, el presente trabajo de tesis tiene por finalidad aislar e identificar actinomicetos de los sedimentos acuosos de la laguna Morón, como una nueva y potencial fuente de metabolitos

bioactivos, enfocándonos en la evaluación del potencial antibacteriano contra bacterias de interés clínico.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA:

En la actualidad, la multiresistencia antibiótica pone en peligro el tratamiento de un número creciente de enfermedades infecciosas⁴. El fácil acceso y el uso inapropiado de fármacos para combatir las infecciones causadas por microorganismos patógenos, promueve la auto prescripción, lo que facilita la selección, persistencia y diseminación de microorganismos resistentes¹².

Diversos informes científicos en salud pública muestran que una gran variedad de bacterias patógenas de humanos como Staphylococcus, Mycobacterium, Streptococcus, Enterococcus han desarrollado resistencia a fármacos, fenómeno que ha promovido la búsqueda de más y mejores antibióticos, especialmente porque estas bacterias son una clara amenaza a la salud mundial^{13, 14}.

Los antibióticos inhiben el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos de diversas categorías taxonómicas¹³. Los actinomicetos de género Streptomyces son los mayores productores de antibióticos, ya que son los responsables de la producción de los dos tercios del total de las moléculas microbianas actualmente comercializadas en el mercado mundial¹⁵. Estos microorganismos, han sido objeto de una variedad de estudios debido a su importancia económica y médica para la producción de antibióticos. Asimismo, en la actualidad se continúa la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas en otros géneros de actinomicetos^{13, 14}.

Después de un breve recorrido por los productos farmacéuticos que ofrecen los microhabitantes terrestres y todo el potencial que se espera de los acuáticos, es imposible dejar de pensar en los miles de microorganismos que ahí habitan, más de uno podría contribuir al tratamiento de alguno de los grandes males que aquejan a nuestro mundo actual⁶.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

El incremento de la resistencia a los antibióticos y la diseminación de las bacterias resistentes se ven favorecidos por las fuertes presiones selectivas derivadas de la utilización en forma excesiva e inapropiada de estas drogas en medicina humana y veterinaria y en las prácticas agrícolas, la plasticidad genética de los microorganismos y los deficientes hábitos higiénicos de amplios sectores de la población mundial¹⁶.

Asimismo, la industria farmacéutica elabora muy pocos medicamentos nuevos para reemplazar los que han perdido su eficacia, la generación de medicamentos nuevos se está estancando y son pocos los incentivos para elaborar antimicrobianos nuevos que permitan combatir los problemas mundiales de la farmacoresistencia².

En este sentido, se apuesta investigar a los actinomicetos, siendo de gran importancia sus múltiples acciones farmacológicas y sobretodo su prometedora capacidad antimicrobiana para enfrentar a las diferentes cepas patógenas que afecta a la población mundial.

La pregunta es:

¿Tendrán actividad antibacteriana los actinomicetos aislados a partir de sedimentos acuosos de la laguna Morón de la provincia Pisco – Ica?

1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA:

Actualmente, la resistencia antimicrobiana sigue siendo una amenaza cada vez mayor para la salud pública a nivel mundial².

Ante esta problemática, los microorganismos acuáticos (los actinomicetos) han despertado gran interés debido a su amplia biodiversidad microbiana y capacidad biosintética; incrementando las posibilidades de encontrar diferentes antibióticos

que contrarresten los grandes problemas originados a partir de la resistencia que los microorganismos patógenos actuales han desarrollado¹⁷.

En tal razón, este Proyecto de Investigación, pretende contribuir en la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas originarias de nuestro país, actuando de forma urgente y coordinada con instituciones sanitarias, universidades y las industrias farmacéuticas para luchar contra esta real amenaza, fomentando el apoyo y la inversión a la investigación que impulse el interés de la industria por el descubrimiento y desarrollo de nuevos antimicrobianos. De esta manera, se busca contrarrestar esta grave amenaza contra la salud pública mundial.

1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:

1.4.1 Objetivo General

- *Determinar la actividad antibacteriana de los Actinomicetos aislados e identificados a partir de sedimentos acuosos de la Laguna de Morón – Pisco.*

1.4.2 Objetivos Específicos

- *Aislar actinomicetos a partir de sedimentos acuosos de la laguna Morón*
- *Identificar los Actinomicetos a nivel de género a partir de sedimentos acuosos.*
- *Determinar que géneros o especies de actinomicetos presentan actividad antibacteriana frente a bacteria de interés clínico.*

1.5. HIPÓTESIS Y VARIABLES:

▪ Hipótesis General:

- *“Los actinomicetos aislados e identificados a partir de sedimentos acuosos de la laguna Morón de la provincia de Pisco tienen actividad antibacteriana.*

- **VARIABLES:**

- **Variable independiente:** *Actinomicetos de sedimentos acuosos de la Laguna Morón – Pisco.*
- **Variable dependiente:** *Actividad antibacteriana.*

CAPÍTULO II BASES TEÓRICAS

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

- **Leiva y col. (2004).**- *Aislaron 62 cepas de actinomicetos desde ambientes acuáticos del sur de Chile a partir de muestras de sedimento de 8 esteros y ríos tributarios del lago Riñihue y del propio lago y de tres lagos de Chiloé (Natri, Tarahuín y Tepuhueico). Las pruebas de antagonismo demostraron que de las 62 cepas de actinomycetes aislados, 36 tuvieron actividad antimicrobiana, en donde la mayoría de los casos positivos fue contra *B. subtilis* (37,1%) y *C. albicans* (16,1%). Estos resultados son prometedores si se considera que los antimicóticos de uso clínico son escasos. Algunas cepas aisladas, como el *Streptomyces* LRI-4A y la *Micropolyspora* LRI-1A exhibieron un amplio espectro de inhibición, tanto sobre Gram negativos, Gram positivos y *C. albicans*¹⁰.*
- **Gebreyohannes y col (2013).**- *Obtuvieron un total de 31 cepas de actinomicetos y se probaron frente a cepas bacterianas Gram (+) y Gram (-). En el aislamiento primario, se identificaron 11 cepas prometedoras de las cuales se obtuvieron los extractos para los ensayos de actividad antibacteriana. El resultado obtenido por método de*

*difusión en agar fue mejor que el método de difusión en disco. Los extractos en bruto mostraron una mayor zona de inhibición contra las bacterias Gram (+) que las bacterias Gram (-). El análisis de varianza confirmó la mayor parte de los extractos crudos fueron estadísticamente significativas en el intervalo de confianza del 95%. La concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima de extractos crudos fueron 1,65 mg / mL y 3,30 mg / mL contra *Staphylococcus aureus*, y 1,84 mg / mL y 3,80 mg / mL contra *Escherichia coli*, respectivamente⁵.*

- **Honorio y col (2015).** – Aislaron 46 cepas a partir de 17 muestras de sedimento, cuatro cepas se clasificaron solo hasta orden (*Actinomycetales bacterium*) (9%), cinco no se lograron identificar (11%), las restantes pertenecieron a los géneros *Streptomyces* (39%), *Salinispora* (24%), *Actinomadura* (7%), *Nomomuraea* (6%), *Micromonospora* (4%). Se obtuvieron 138 extractos orgánicos, sólo 105 se utilizaron para la prueba antibacteriana. El bioensayo realizado mostró que el 51.4% de los extractos fue activo sólo frente a bacterias Gram positivas con valores de CMI 7.8 a 500 µg mL. El extracto acetónico de la cepa LBC04_07 fue el más bioactivo presentó una CMI de 7.8 µg mL para *E. faecalis* y *S. aureus*, esta concentración fue la más baja encontrada. La cepa LBC24_01 en el extracto metanólico presentó una CMI 15.6 µg mL frente a *S. aureus* de 31.25 µg mL frente a *E. faecalis*. La mayoría de los extractos mostraron ser más activos frente a *E. faecalis*. El análisis químico del extracto producido por *Streptomyces* sp. LBC04_07 se está llevando a cabo con el fin de identificar el o los compuestos activos¹⁸.

2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES

- **León y col. (2007).**- *Abstraeron un total de 62 actinomicetos, de los cuales 31 (50%) mostraron actividad antibacteriana frente a Staphylococcus aureus, 36 (59%) frente a Pseudomonas aeruginosa y 23 (37%) a ambos patógenos. Las cepas de actinomicetos I-400^a y M10-77 identificadas en cada caso como Streptomyces y Thermoactinomyces fueron las que exhibieron mayor actividad inhibitoria frente a P. aeruginosa y S. aureus respectivamente. Así mismo, 13 actinomicetos (20,97%) mostraron actividad antifúngica frente a cultivos de Candida albicans cepa 1511 y 17 (27,42%) frente a Candida albicans cepa 1511MIC; sin embargo, ningún actinomiceto presentó actividad inhibitoria frente a Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus y Trichophyton mentagrophytes¹⁹.*
- **León y col. (2011).**- *Aislaron 29 cepas de actinomicetos marinos de la costa central del Perú y evaluaron su actividad antibacteriana frente a Staphylococcus aureus meticilina resistentes y Enterococcus faecalis vancomicina resistentes. Los porcentajes inhibitorios fueron superiores a 85% para ambos patógenos con halos de inhibición mayores a 69 y 78 mm de diámetro para Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA) y Enterococcus (VRE) respectivamente. Los extractos diclorometánicos de tres de los actinomicetos aislados (I-400A, B1-T61, M10-77) mostraron gran potencial inhibitorio de ambos patógenos, siendo M10-77 la cepa de actinomiceto de mayor actividad antibiótica frente a S. aureus ATCC 43300 resistente a meticilina y E. faecalis ATCC 51299 resistente a vancomicina con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 7,9 y 31,7 µg/mL respectivamente⁴.*

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1. ACTINOMICETOS

Los actinomicetos representan un grupo ubicuo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y presentan gran importancia por su participación en la degradación de materia orgánica²⁰. Estos microorganismos resultan ser abundantes en suelos, sin embargo, también son encontrados en ambientes acuáticos dulces y marinos¹⁰, dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo, debido a su actividad metabólica y a la producción de terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal²¹.

Durante mucho tiempo se pensó que las Actinobacterias eran hongos debido a la similitud en sus características morfológicas y a la presencia de un micelio verdadero; sin embargo, se han clasificado como bacterias por su carácter procariota y los componentes de su pared celular, en particular la composición de lípidos y peptidoglicano²².

La mayoría de actinobacterias son mesófilas y sus condiciones más favorables de crecimiento se encuentran entre 25 y 30°C. Estos microorganismos generalmente son aerobios y tienen la capacidad de degradar macromoléculas debido a la producción de enzimas extracelulares²³.

2.2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Los actinomicetos pertenecen al phylum Actinobacteria, clase I Actinobacteria, subclase V Actinobacteriae y orden Actinomycetales que se divide en subórdenes, familias y géneros^{24, 25, 26}.

Tabla 1. Propuesta para un nuevo sistema de clasificación jerárquica, *Actinobacteria Classis nov*; 1997²⁶.

SUBORDEN	FAMILIA	GÉNEROS
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>
	<i>Actinoplanaceae</i>	<i>Ampullariella</i> <i>Planobispora</i> <i>Actinoplana</i> <i>Planomonospora</i> <i>Streptosporangium</i> <i>Dactilosporangium</i> <i>Spirillospora</i>
<i>Frankineae</i>	<i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Sporichthyaceae</i>	<i>Frankia</i> <i>Geodermatophilus</i> <i>Sporichhya</i>
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinosynnema</i> <i>Saccharopolyspora</i>
<i>Corynebacterineae</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Micropolyspora</i>

		<i>Chainia</i> <i>Elytrosporangium</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Kitasatoa</i> <i>Microellobisporia</i>
	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>
	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Micrococcineae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i> <i>Arthobacter</i>
	<i>Microbacteriaceae</i> <i>Dermatophilaceae</i>	<i>Microbacterium</i> <i>Dermatophilus</i>
<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i> <i>Agromyces</i> <i>Arachnia</i> <i>Bacterionema</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Rothia</i>
<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioideaceae</i>	<i>Propiobacterium</i>
<i>Streptosporangineaea</i>	<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Thermomonospora</i> <i>Actinomadura</i> <i>Microbispora</i> <i>Microtetraspora</i> <i>Saccharomonospora</i>

	<i>Thermoactinomycetaceae</i>	<i>Thermoactinomyces</i>
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Glycomyces</i>

Existen diversos criterios de clasificación que también se han utilizados para los actinomicetos como:

- **Quimiotaxonomía:** *Consiste en el estudio de la composición de la pared celular, el tipo de peptidoglicano incluyendo azúcares e isómeros de ácido diaminopimélico (DAP), el patrón de los ácidos grasos y de fosfolípido de la membrana, las menaquinonas y su grado de hidrogenación, contenido y tipo de ácido micólicos, y el porcentaje molar de relación Guanina – Citosina (mol%: porcentaje molar de G+C)^{24, 27}.*
- **Fagotipificación:** *Se basa en aprovechar la especificidad de los actinofagos por el hospedero, consiguiéndose identificar el género y especie. Este criterio es principalmente para *Streptomyces* sp²⁸.*
- **Otros criterios:** *La serología, las pruebas bioquímicas (empleadas para una rápida identificación) y las pruebas de detección de enzimas bacterianas mediante el desarrollo de sustratos cromogénicos y fluorogénicos²⁷.*
- **Métodos moleculares:** *Es un criterio utilizado para una mejor clasificación, debido a que existen aislamientos bacterianos que no concuerdan con los patrones de identificación. Por tal, el empleo de estas herramientas para analizar los genomas de las bacterias ha sido un gran aporte para la taxonomía bacteriana, Filogenéticamente los*

*actinomicetos forman una subdivisión de los organismos del dominio Bacteria, diferente de los formadores de endosporas y de los cocos Gram positivos*²⁹.

Figura 1. *Kitasano University; Árbol filogenético. Discover Life – Bacteria: Actinomicetos*³⁰.

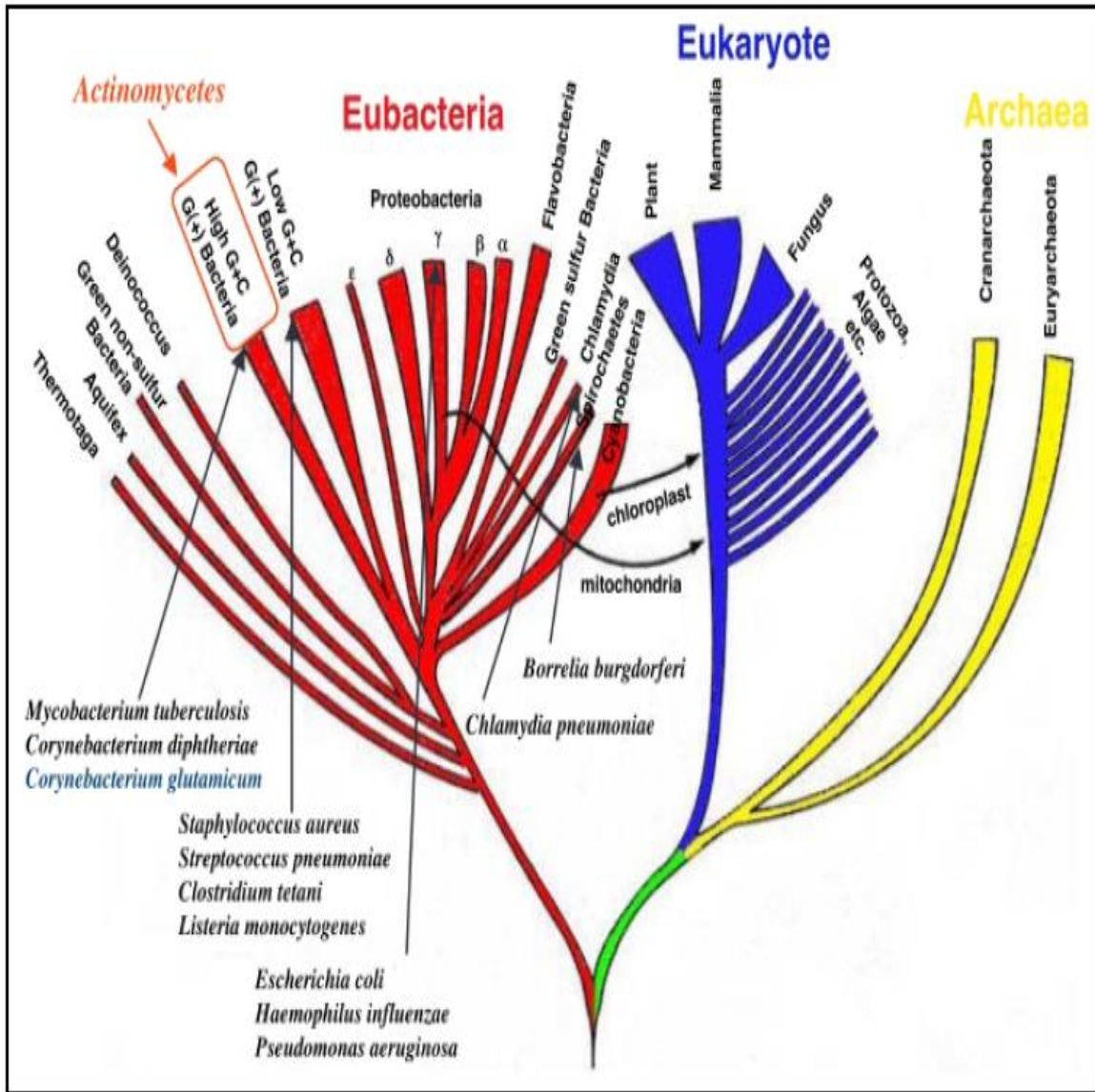
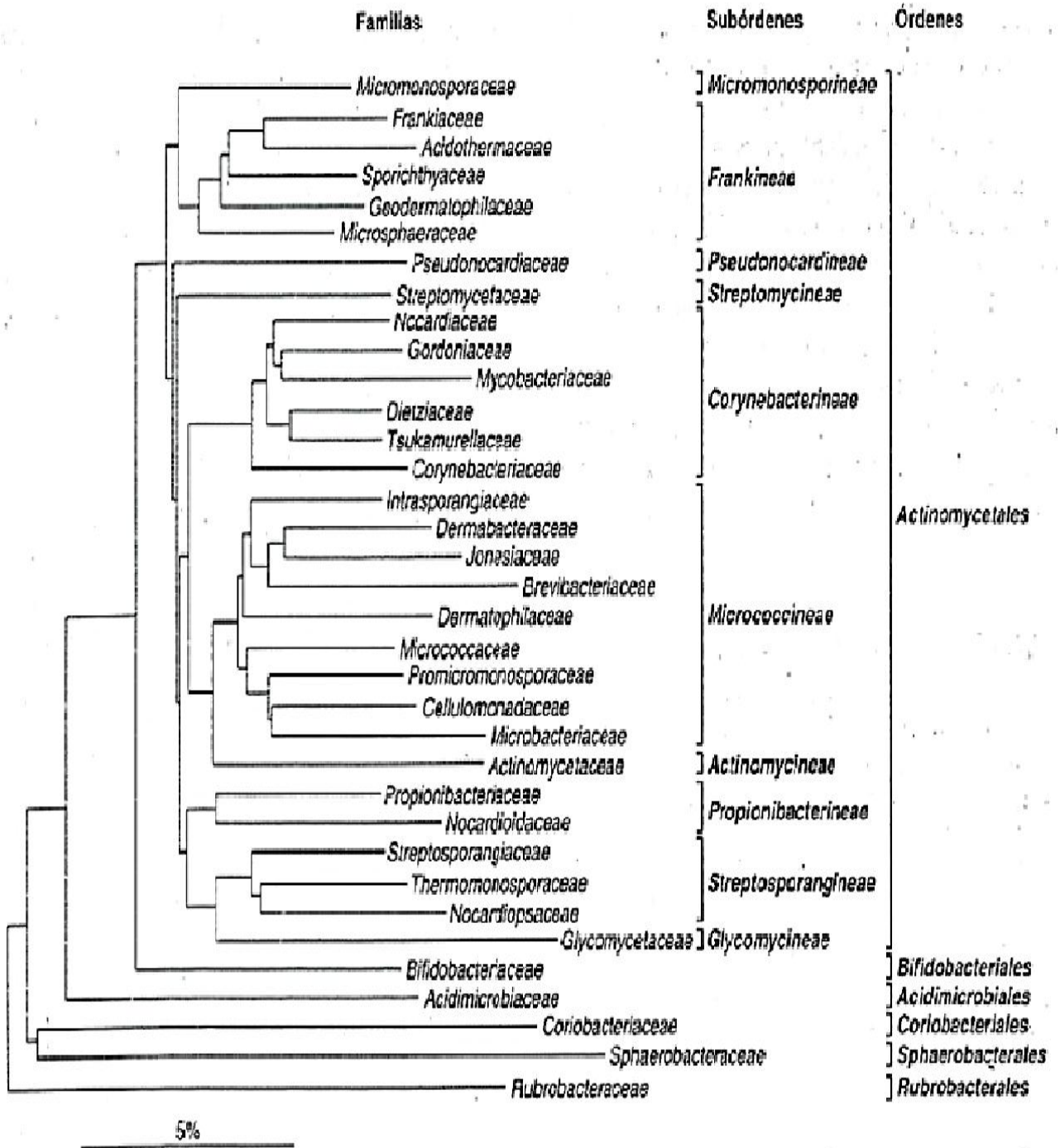


Figura 2. Árbol filogenético de la clase Actinobacteria basado en el estudio de ADNr/ARNr 16S²⁶.



2.2.1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las células de los actinomicetos químicamente están compuestas por un 45% de carbono y un 10% de nitrógeno, el contenido lipídico varía de un 12 a un 65%. Su pared celular difiere químicamente según los grupos, dando paso a la identificación y clasificación de los mismos; básicamente se diferencian siete tipos de pared celular, teniendo en cuenta el aminoácido diaminado, los azúcares característicos y la presencia de glicina en el puente interpeptídico²³.

Tabla 2. Tipos de paredes celulares de los Actinomicetos²².

TIPOS DE PARED CELULAR	AMINOÁCIDO DIAMINADO	AZÚCARES CARACTERÍSTICOS	GLICINA EN EL PUENTE INTERPEPTÍDICO	MICROORGANISMOS REPRESENTATIVO
<i>I</i>	<i>L-DAO</i>	<i>NA</i>	+	<i>Streptomyces Intrasporangium</i>
<i>II</i>	<i>m-DAP</i>	<i>NA</i>	+	<i>Actinoplanes Micromonospora</i>
<i>III</i>	<i>m-DAP</i>	<i>Madurosa</i>	-	<i>Microbispora, Frankia</i>
<i>IV</i>	<i>m-DAP</i>	<i>Arabinosa, Galactosa</i>	-	<i>Corynebacterium Nocardia</i>
<i>V</i>	<i>N.A.</i>	<i>N.A.</i>	-	<i>Actinomyces israelii</i>
<i>VI</i>	<i>N.A.</i>	<i>Galactosa</i>	-	<i>Oerskovia turbata Cellulomonas</i>
<i>VII</i>	<i>DAB</i>	<i>N.A.</i>	+	<i>Agromyces</i>
NA (no aplicable, o bien no se detecta un azúcar diferencial); DAB (Ácido diaminobutírico); DAP (Ácido diaminopimélico).				

Algunas especies presentan hexosamina en la pared celular en un 2 a un 18%. Adicionalmente especies como Streptomyces y Nocardia contienen alanina, metionina, valina, arginina, lisina, leucina, hexosamina, isoleucina, ácido glutámico, treonina y asparagina²³.

De igual manera se presentan diversos tipos de peptidoglucano que se clasifican de acuerdo al tipo de aminoácido ubicado en la posición 3 de la cadena lateral del tetrapéptido, a la posición del puente entre dos cadenas vecinas (posición 3 y 4 peptidoglucano tipo A y 2 y 4 para peptidoglucano tipo B) y al tipo de péptido presente en la cadena interpeptídica³¹.

2.2.1.3 IMPORTANCIA DE LOS ACTINOMICETOS

La importancia de las actinobacterias radica en que son los microorganismos que más agentes antimicrobianos han aportado en el tratamiento de enfermedades y con mayor frecuencia producen compuestos inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas. Aproximadamente, 22.500 metabolitos secundarios bioactivos han sido aislados de microorganismos, de los cuales 10.000 de esos compuestos han sido producidos por actinobacterias, lo que representa el 45% de los metabolitos secundarios bioactivos que se han descubierto^{32, 33}.

Cerca de 7.600 de estos compuestos, es decir el 75% han sido producidos por el género Streptomyces. Sin embargo, otras Actinobacterias como Actinomadura, Marinispora, Saccharopolyspora, Nocardiosis, Salinispora, Verrucosipora Amycolatopsis, Micromonospora y Actinoplanes también producen metabolitos secundarios bioactivos pero en menor proporción³⁴. Se ha demostrado que estos compuestos poseen actividad citotóxica, antitumoral, antiviral, antiparasitaria, insecticida, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante, inmunosupresora y además presentan inhibición enzimática³⁵.

También, los actinomicetos participan en procesos de degradación de materia orgánica, incluyendo lignina y quitina como en la formación y estabilización de pilas de compostaje y humus²³. Siendo cuantitativa y cualitativamente importantes en la rizofera, pueden influir en el crecimiento de las plantas y la protección de sus raíces contra la invasión por hongos patógenos. Adicionalmente éstos pueden participar en la formación de micorrizas, y en la producción de compuestos herbicidas e insecticidas³⁶. Además de la función ecológica de los actinomicetos, estos microorganismos son de suma importancia debido a que han demostrado ser la fuente más importante de metabolitos secundarios bioactivos de valor industrial y comercial²¹.

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular. De hecho, las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido su capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales. Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas³⁷. En el caso de los actinomicetos, es ampliamente reconocida la capacidad que tienen de producir una gama muy variada de metabolitos secundarios³⁸. En la Tabla 3, se presenta en resumen la Diversidad de aplicaciones biotecnológicas en diferentes aéreas de las actividades humanas de compuestos producidos por actinomicetos.

Tabla 3. *Diversidad de aplicaciones biotecnológicas en diferentes aéreas de las actividades humanas de compuestos producidos por actinomicetos*³⁹.

Utilización	Ejemplo de compuestos	Actinomiceto involucrado
Antibiótica: inhibición y eliminación de bacterias que causan enfermedades (infecciones)	Estreptomicina Marinomicinas Vancomicina Rifampicina	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Marinispora</i> sp <i>Streptomyces orientalis</i> <i>Streptomyces mediterranei</i>
Antifúngica: inhibición del crecimiento de hongos patógenos	Anfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>
Anticáncer, antitumoral: inhibidor de proteosomas, fármaco de quimioterapia anticanceroso u inhibidor de enzimas cinasas	Salinosporamida A	<i>Salinis poratropica</i> <i>Streptomyces lavendulae</i> <i>Streptomyces</i> sp
Antiinflamatoria: reduce la inflamación de los tejidos	Salinamidas A y B	<i>Streptomyces</i> sp
Antiparasítica: acaricida y antihelmíntico	Avermectinas	<i>Streptomyces avermitilis</i>
Antimalaria: presenta efectos antiproliferativos	Trioxacarcina	<i>Streptomyces</i> sp
Pigmentos: uso como colorantes en alimentos	Carotenoides	<i>Streptomyces</i> sp
Agrícola: biofertilizantes	Formulaciones agrícolas	<i>Streptomyces</i> sp
Agrícola: biofungicida	Formulaciones agrícolas	<i>Streptomyces lydicus</i>
Acuicultura: utilizado para controlar enfermedades en peces	Probióticos	<i>Streptomyces</i> sp
Enzimático: aplicaciones en las industrias de los alimentos, bebidas, fermentaciones, uso terapéutico, procesamiento de la pulpa de papel, elaboración de detergentes, tratamiento de desechos agroindustriales y del procesamiento de camarón, entre otras	Amilasas, Proteasas, Celulasas, Quitinasas	<i>Streptomyces</i> sp

2.2.1.4 HÁBITAT

*Los actinomicetos son microorganismos muy ubicuos que se encuentran en la gran mayoría de sustratos naturales, ampliamente distribuidos en una gran variedad de hábitats diferentes: suelo, agua marina, agua dulce, aire, estiércol, fango de ríos y fondo de lagunas y lagos*⁴⁰.

*Estos microorganismos, pueden ser aislados de ecosistemas de agua dulce, especialmente de sedimentos de ríos y lagos. Los Streptomyces pueden ser aislados de zonas litorales y costeras, así como de sedimentos de aguas profundas*⁴¹.

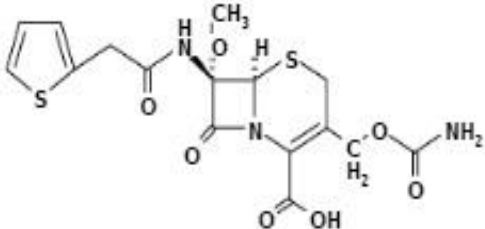
2.2.2 ANTIBIÓTICOS

Los metabolitos microbianos más importantes son los antibióticos, sustancias que a bajas concentraciones inhiben el crecimiento de diferentes especies de

microorganismos y que ejercen su mayor efecto sobre la salud, nutrición y economía de la sociedad^{37, 42}. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (es decir la gama de microorganismos sobre los cuales puede actuar el antibiótico). Se han utilizado de manera indistinta los términos antibiótico, antimicrobiano y quimioterapéutico para designar sustancias químicas definidas con actividad contra microorganismos específicos^{14, 43}.

Los antibióticos se agrupan en familias, caracterizadas porque agrupan compuestos que tienen una estructura química similar y comparten el mismo mecanismo de acción antimicrobiano⁴². De manera breve se describen algunos de los antibióticos producidos por actinomicetos. La tabla 4 muestra los principales antibióticos, su estructura química y el sitio donde actúan.

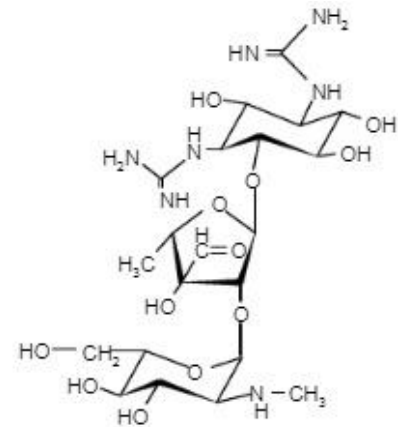
Tabla 4. Clasificación de los principales antibióticos producidos por actinomicetos de acuerdo a su estructura química³⁹.

CLASIFICACIÓN	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA
B – LACTÁMICOS	<p>Cefoxitina. (Cefamicina semisintética)</p> <p><i>Inhibe síntesis de pared celular</i></p>	

AMINOGLUCÓSIDOS

Estreptomina.

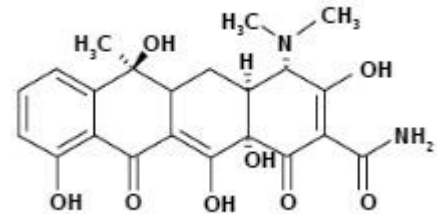
*Inhibe síntesis
de proteínas.
Unión en la
subunidad
ribosomal 30S.*



TETRACICLINAS

Tetraciclina.

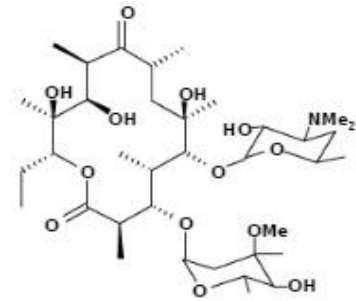
*Inhibe síntesis
de proteínas.
Unión en la
subunidad
ribosomal 30S.*



MACRÓLIDOS

Eritromicina.

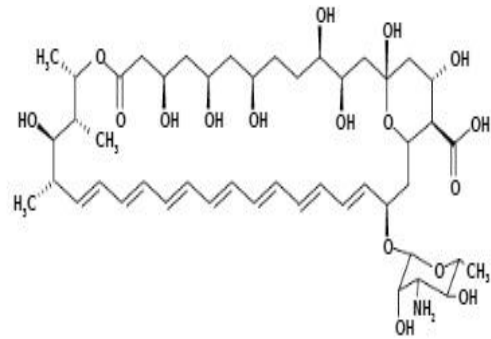
*Inhibe síntesis
de proteínas.
Unión en la
subunidad
ribosomal 50S.*



POLIENOS

Amfotericina B.

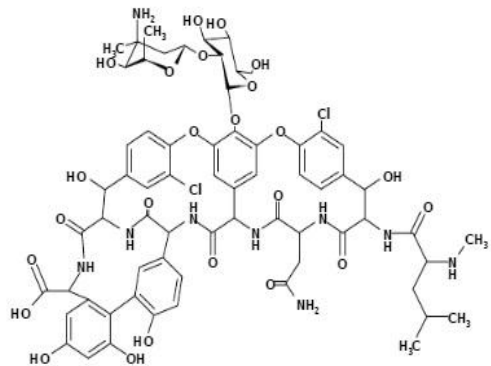
Alteración de permeabilidad en la membrana.



GLICOPÉPTIDOS

Vancomicina.

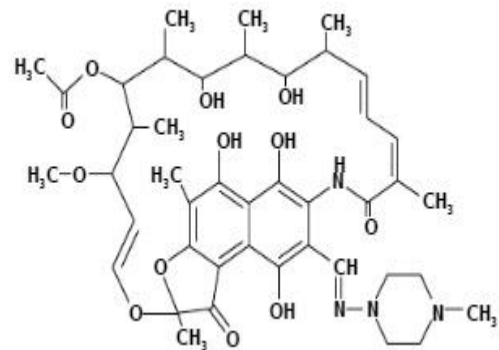
Inhibe síntesis de pared celular.



RIFAMICINAS

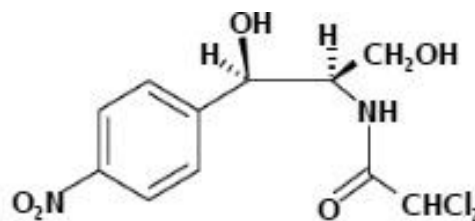
Rifampicina.

*Inhibición de síntesis de RNA.
Unión a la RNA polimerasa.*



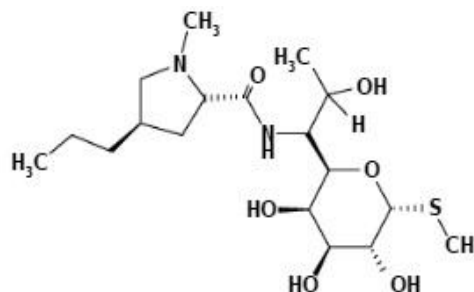
FENICOLES**Cloranfenicol.**

*Inhibe síntesis de proteínas.
Unión en la subunidad 50S.*



**AZÚCARES
COMPLEJOS****Lincomicina.**

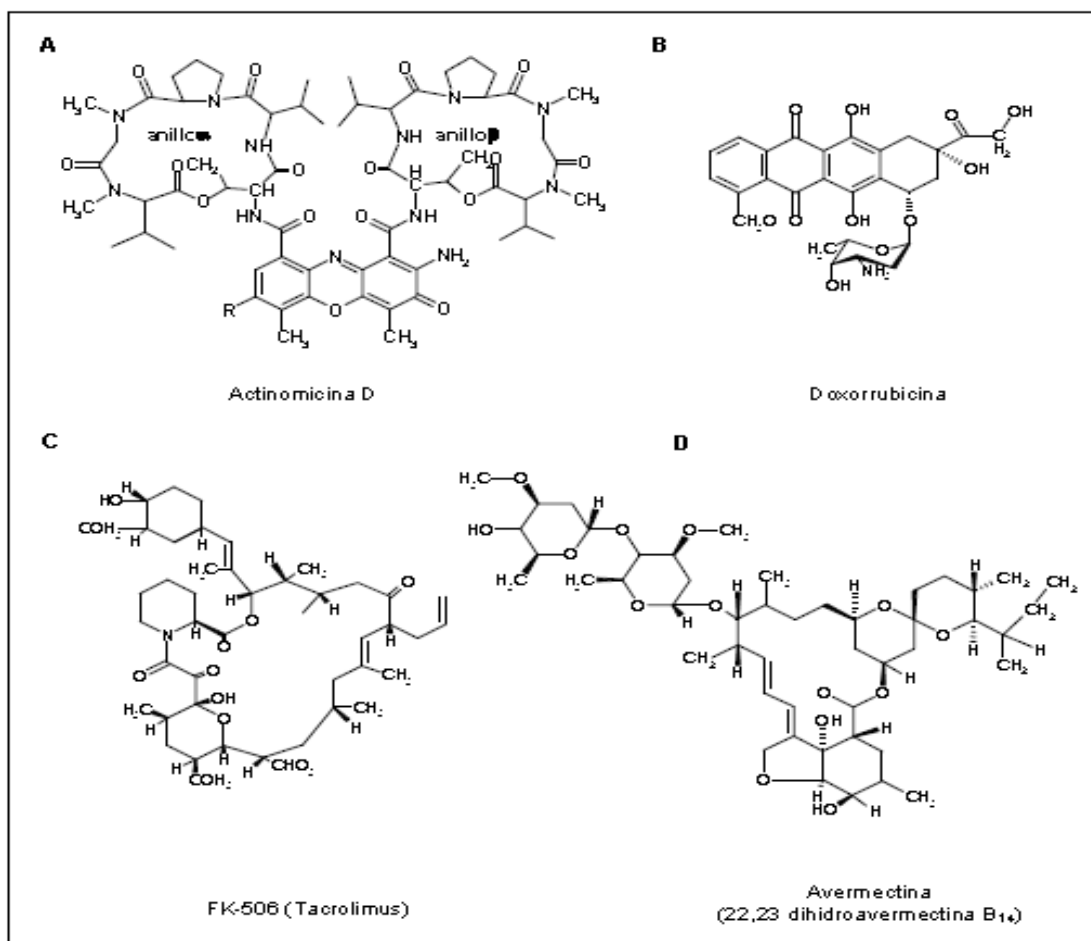
*Inhibe síntesis de proteínas.
Unión en la subunidad 50S.*



La mayoría de los compuestos usados para quimioterapia de tumores son antibióticos producidos por actinomicetos⁴⁴, dentro de los que se encuentran actinomicina D, mitomicina, bleomicina, neomicina y las antraciclinas, daunorubicina y doxorubicina⁴⁵.

La actinomicina D es un antibiótico polipeptídico aislado de Streptomyces, al que se le reconoció actividad anticancerígena, aunque debido a su elevada toxicidad no es un compuesto muy usado. Sin embargo, es ampliamente utilizado en investigación de biología celular para inhibir la transcripción al unirse al DNA en el complejo de inicio de la transcripción, evitando la elongación del RNA por la RNA polimerasa⁴⁶.

Figura 3. Metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces* con actividades antitumoral (A,B), inmunosupresora (C) y contra parásito (D)³⁹.



2.2.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

2.2.3.1 MICROORGANISMOS – BACTERIAS:

*La bacteria es un microorganismo que nace, crece, se reproduce y muere con su constitución y metabolismo propio*⁴⁷.

*Las bacterias son organismos unicelulares microscópicos que prosperan en ambientes diversos. Pueden vivir en el suelo, en el océano y en el interior del intestino humano. Las bacterias son procariontas*⁴⁸.

Se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared. Un grupo, las denominadas gram-positivas, sólo poseen

peptidoglucano; el otro, las denominadas gram-negativas, tienen adosadas por fuera del peptidoglucano una membrana rica en lipopolisacáridos⁴⁹.

2.2.3.2 CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO:

2.2.3.2.1 Cepas bacterianas Gram – negativas:

- ***Escherichia coli NCTC 13216:*** *E. coli* es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa del aparato digestivo de la mayor parte de los animales y del hombre y por tanto, se elimina por las heces al exterior^{50, 51}.

Se trata, dependiendo de los serotipos, de una de las zoonosis alimentarias más frecuentes e importantes en el hombre debido a la gravedad de los cuadros clínicos y al número de afectados, pudiendo suponer un grave riesgo para la salud pública. En el hombre, la colibacilosis entérica se produce por la penetración de E. coli a través de los alimentos permaneciendo en el epitelio intestinal causando, en general, cuadros de diarrea que en casos más graves pueden evolucionar a disentería, colitis hemorrágica (CH), el síndrome urémico hemolítico (SUH) e incluso a púrpura trombocitopénica (PTT)^{52,53}.

Estas cepas, constituyen la principal causa de infecciones urinarias (ITU), meningitis neonatales, septicemias, peritonitis, mastitis, neumonía, etc.⁵³

- ***Salmonella Typhimurium ATCC 14028:*** *Las salmonellas son bacterias gram-negativas. La S. typhi es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno⁵⁴.*

Son causa importante de enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo. La bacteria generalmente se transmite a los seres humanos a través del consumo de los alimentos contaminados de origen animal, principalmente carne, pollo, huevos y leche. Los síntomas de la infección por salmonella suelen aparecer de 12 a 72 horas después de la infección, e incluyen fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y a veces vómitos⁵⁵.

- ***Pseudomona aeruginosa ATCC 27853:*** *Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo, móvil por flagelo polar único, aerobio, no esporulador, oxidasa positivo, catalasa positiva, que produce pigmentos fluorescentes verde-amarillentos, indol negativo y rojo de metilo negativo⁵⁶.*

Está asociada a infecciones de los tractos respiratorio y urinario; infecciones en quemados u otros traumatismos severos que afecten a amplias zonas de la piel o bien en pacientes con fibrosis quística; sin embargo, no es un parásito estricto, sino un oportunista típico, especialmente en medios hospitalarios, iniciando una infección cuando el individuo se encuentra inmunocomprometido; también puede causar infecciones sistémicas, infecciones nosocomiales derivadas de cateterismos, traqueotomías, punciones lumbares y transfusiones; infecciones en pacientes con tratamientos inmunosupresores, corticosteroides, antibióticos o radiaciones; puede contaminar heridas quirúrgicas, abscesos, quemaduras e infecciones de oído^{57, 58}.

Se propaga debido a su presencia en verduras frescas, crema para manos, uñas artificiales y acrílicas del personal

hospitalario, nebulizadores, analizadores de oxígeno, monitoreo urodinámico, máquinas de diálisis, endoscopios entre otros⁵⁹.

2.2.3.2.2 CEPAS BACTERIANAS GRAM – POSITIVAS:

- ***Staphylococcus aureus ATCC 25923:*** Los integrantes del género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos de 0,5 -1,5 μm de diámetro, distribuido en grupos irregulares a manera de racimos; posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Son inmóviles, facultativamente anaerobios⁶⁰. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis; infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales; el 40 a 50% de los seres humanos aproximadamente son portadores nasales de *Staphylococcus aureus*, estas se encuentran en las ropas personales, de cama o de ambientes humanos. En la actualidad las cepas de *Staphylococcus aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes^{60, 61}.
- ***Enterococcus faecalis ATCC 29212:*** *Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positiva, comensal, anaerobia facultativa, capaz de formar biofilms y con la particularidad de poseer adhesinas capaces de unirse a las células epiteliales que tapizan la mucosa oral, intestinal o urinaria. En la cavidad oral, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, se localizan colonias de *Enterococcus faecalis* en la mucosa oral, el dorso de la lengua y la placa dental como parte de la microbiota⁶².

Las infecciones del tracto urinario, de heridas quirúrgicas y las bacteriemias o septicemias, son las entidades clínicas más frecuentes producidas por este microorganismo. La endocarditis, por su impacto clínico, es de gran importancia y se produce con mayor frecuencia en los pacientes hemodializados, con cardiopatías previas, afecciones colorrectales y personas sanas de edad avanzada. También producen otras infecciones entre las que se encuentran infecciones del tracto biliar, sepsis ligada a catéter, abscesos intrabdominales como complicación de diverticulitis, apendicitis y peritonitis recurrentes en pacientes quirúrgicos e infecciones pélvicas. También se describe como causante de infecciones asociadas a dispositivos ortopédicos después de artroplastias^{62,63}.

- ***Staphylococcus epidermidis ATCC 12228:*** *El S. epidermidis, se caracteriza por ser coagulasa negativo y novobiacina sensible, fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante y es considerado el agente causal de diferentes entidades clínicas, entre ellas: Infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteriemia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardiacas protésicas e implantes de mama)*⁶⁴.

2.2.4 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA

2.2.4.1 PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA:

Los parámetros químicos son más relacionados con los agroquímicos, metales pesados y desechos tóxicos. Este tipo de contaminación es más usual en las aguas subterráneas en comparación con las aguas superficiales. Relacionado por la dinámica del flujo de agua, los contaminantes son más persistentes y menos móviles en el agua subterránea, como es el caso de la contaminación con nitratos por su movilidad y estabilidad, por la presencia de asentamientos urbanos o actividades agrícolas aledañas⁶⁵.

- **pH o concentraciones de iones hidrógeno:** *Es la concentración relativa de los iones hidrógeno en el agua, es la que indica si ésta actuará como un ácido débil, o si se comportará como una solución alcalina. Es una medición valiosa para interpretar los rangos de solubilidad de los componentes químicos. Esta mide la acidez o la alcalinidad del agua. La actividad del ión hidrógeno puede afectar directa o indirectamente la actividad de otros constituyentes presentes en el agua, la medida del pH constituye un parámetro de importancia para la descripción de los sistemas biológicos y químicos de las aguas naturales⁶⁵.*

- **Demanda Bioquímica de Oxígeno:** *Es un parámetro que representa la materia orgánica biodegradable. Es la más usada para determinar la eficiencia de los tratamientos que se aplican a los líquidos residuales. Se da cuando ciertas sustancias presentes en las aguas residuales, al verterse a un curso de agua, captan el oxígeno existente debido a la presencia de sustancias químicas reductoras. Esta es una medida de la*

estimación de las materias oxidables presentes en el agua, cualquiera que sea su origen orgánico o mineral como el hierro, nitritos, amoníaco, sulfuro y cloruros⁶⁵.

- **Demanda química de Oxígeno:** *Es la cantidad de oxígeno que se requiere para oxidar químicamente el material orgánico. Difiere de la DBO en que en esta última prueba solo se detecta el material orgánico degradado biológicamente o que es biodegradable. En la determinación de DQO todo el material orgánico biodegradable y no biodegradable es químicamente oxidado por el dicromato de potasio en medio ácido en la presencia de un catalizador. Para esto se emplea una mezcla de ácido sulfúrico y dicromato de potasio con iones plata como catalizador. En estas condiciones, en un tiempo de dos horas de digestión, a una temperatura de 150°C, el Cromo (VI) pasa al estado de oxidación Cromo (III) oxidando la materia orgánica⁶⁶.*

- **Oxígeno disuelto:** *El oxígeno disuelto es uno de los parámetros más relevantes a la hora de evaluar la calidad del agua. Está asociado a la contaminación orgánica. Su concentración aumenta al disminuir la temperatura y la salinidad y posee una relación directa con la pendiente y la aireación del cauce. Cuando existen condiciones aeróbicas se produce una mineralización que consume oxígeno y produce gas carbónico, nitratos y fosfatos. Una vez que se consume todo el oxígeno comienza la descomposición anaeróbica que produce metano, amonio, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos⁶⁵.*

- **Conductividad:** *Es la cantidad de iones disueltos en agua, lo que influye en la capacidad de conducir electricidad de esta*

(conductividad del agua). Cuanto mayor sea la cantidad de iones disueltos mayor será la conductividad. La temperatura incrementa también al cantidad de iones disueltos (la conductividad aumenta un 2% por cada °C). La conductividad es un indicador de contaminación. El agua dulce suele tener entre 30 y 40 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (aunque en ríos muy calizos puede alcanzar entre 1000 y 2000 $\mu\text{s}/\text{cm}$). Las actividades humanas tienden a aumentar la cantidad de iones disueltos y, por tanto, la conductividad a más de 1000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ alcanzándose en ocasiones 10000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ⁶⁷.

- **Temperatura:** *La temperatura del agua tiene influencia directa en otros factores de la calidad del agua tales como el oxígeno disuelto (OD), la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la supervivencia de algunas especies acuáticas.*

Los animales y plantas acuáticas son sensibles a los cambios de temperatura del agua y requieren que ésta se mantenga dentro de un intervalo determinado para poder sobrevivir y reproducirse. Si la temperatura del agua permanece fuera de este intervalo durante mucho tiempo, los organismos quedarán expuestos a unas condiciones inadecuadas y morirán.

En general, cuando la temperatura del agua es más fría, la cantidad de oxígeno disuelto (OD) debe ser más alta y, por lo tanto, el agua podrá soportar la vida acuática (peces y plantas) con más facilidad⁶⁷.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES:

3.1.1 MATERIALES DE LABORATORIO

- Fiolas.
- Pipetas volumétricas.
- Probetas.
- Propipetas.
- Baguetas.
- Matraces Erlenmeyer.
- Agitadores de vidrio.
- Vaso de precipitado.
- Tubos de ensayos.
- Gradillas para tubos de ensayos.
- Espátulas de metal.
- Luna de reloj.
- Papel de filtro.
- Papel de aluminio
- Guantes.
- Mascarillas.
- Algodón.
- Sacabocado.
- Micropipeta
- Placas Petri.

3.1.2 MATERIALES DE CAMPO

- Bolsas de papel Kraft.
- Papel Kraft.
- Cooler.
- Bolsas ziploc.
- Vasos de polietileno.
- Hilo pabilo.
- Hielo gelatina.

3.1.3 EQUIPOS

- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar Labculture de clase II tipo A2, Cabina de bioseguridad, modelo LA2-4A.
- Sistema de producción de agua ultra pura Direct-QTM 3 de Millipore, compuesto por un módulo de pretatamiento ProgardTM2 2, cartuchos de ósmosis inversa, cartucho Quantum TM Ex y filtros Millipack® 40 (22 µm).
- Estufa esterilizadora
- Horno microondas.
- Incubadora bacteriológica.
- Refrigeradora.
- Balanza de precisión BL- 600.
- Balanza analítica SARTORIUS BASIC.
- Cocina eléctrica.
- pHmetro.
- Espectrofotómetro UV Visible UNICO.
- Conductímetro.
- Estufa esterilizadora BRINDER modelo BD, ED, FD.

3.1.4 FÁRMACOS Y REACTIVOS

- Solución salina (solución de cloruro de sodio 0.85%).
- Agua destilada.
- Discos de Ciprofloxacino 5µg.
- Discos de Estreptomina.
- Discos de Eritromicina.
- Nistatina 100.000 UI SUSP X 12 mL.
- Cicloheximida.
- Colorante gram.
- Agar mueller Hinton.
- Agar nutritivo.
- Agar caseína almidón.
- Agar avena.
- Caldo nutritivo.
- Almidón.
- Extracto de levadura.
- Cloruro de bario.
- Ácido sulfúrico.
- Ácido crómico.
- Dicromato de potasio.

3.2 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA:

Las muestras se colectaron en la Laguna Morón, ubicada en la ciudad de Bernal del Distrito de Humay, perteneciente a la provincia de Pisco, departamento de Ica (Fig.5), se eligió este lugar por su alejamiento de centros poblados, casi nula contaminación y absoluto desconocimiento de la microbiota que posee. A partir de la información geográfica de los diferentes puntos de muestreo y haciendo uso de la herramienta Google Earth® se realizó un mapa en el cual se observa claramente la posición de los lotes en los que fueron tomadas los sedimentos acuosos; denotadas por un círculo.

Figura 4. Ubicación geográfica de la Laguna Morón.





3.3. MUESTREO

Las muestras de agua fueron tomadas a 1 m de profundidad con envases estériles. Se estableció seis puntos de muestreo y se obtuvo las muestras de sedimentos acuosos por el método del dragado, traspasándolas en envases de plástico. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico con geles.

Ubicación: 13°45'39.38" S;
75°59'.75" O elevación 276 m
alt. Ojo 1.07Km

posteriormente en el laboratorio de análisis clínicos y de microbiología de la Facultad de

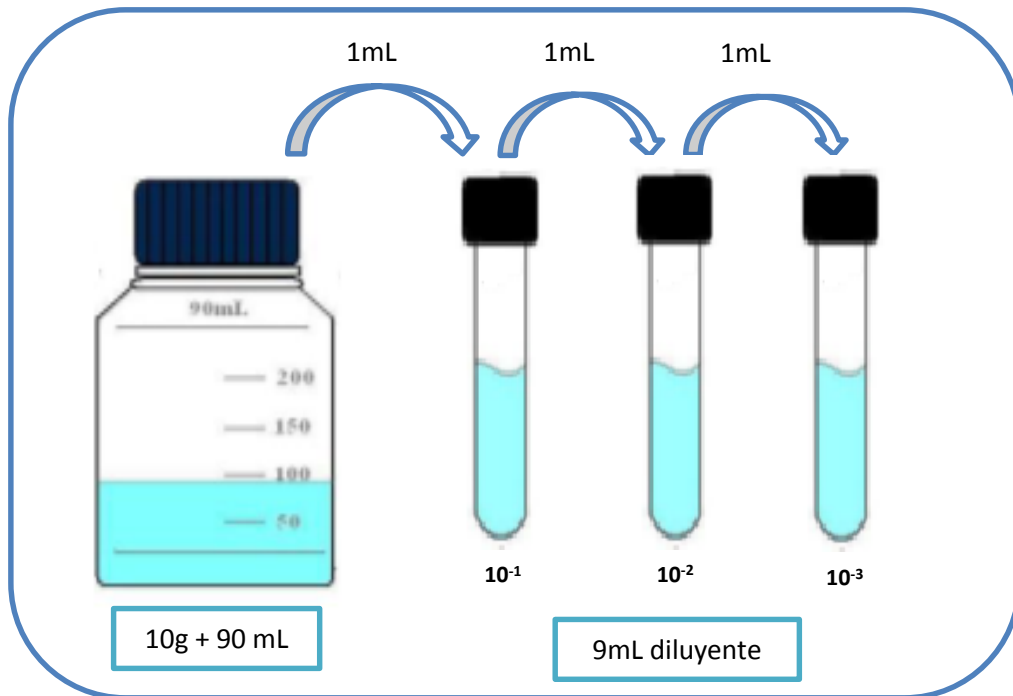
Farmacología y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Cada muestra fue identificada con un código, fecha de muestreo, pH y ubicación de la misma.

3.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA Y AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS

Con el fin de reducir el crecimiento de microorganismos no deseados y favorecer el crecimiento de actinomicetos, se tomó 20 g de las diferentes muestras de sedimentos y se colocaron en vasos de precipitación estériles para someterlos a un tratamiento térmico en baño maría a una temperatura de 50°C por 60 minutos^{68, 69}.

Las diluciones de las muestras de sedimento se sembraron por triplicado en placas de Agar Caseína-Almidón por incorporación de placas suplementados con nistatina y/o cicloheximida (25 y $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente) para inhibir el crecimiento de hongos, seguidamente las placas se incubaron a 28 ± 30 durante 28 días. Las cepas aisladas se preservaron a refrigeración en Agar Avena junto con el método de diluciones seriadas hasta su identificación y realización de ensayos de antibacterianos⁷⁰.

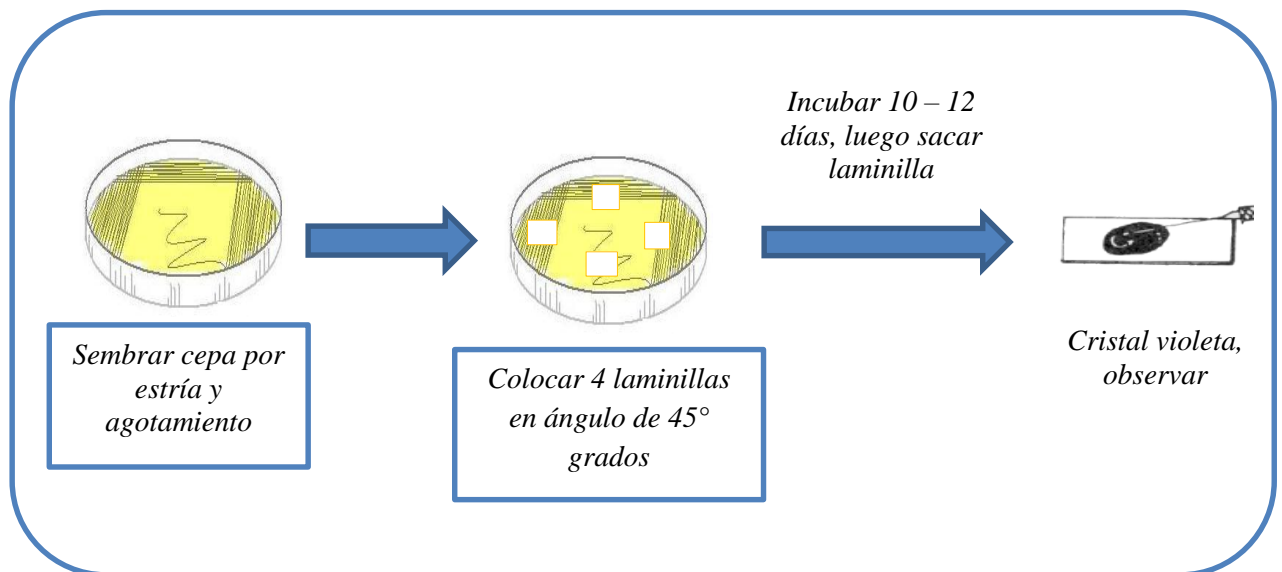
Figura 5. Diluciones en series



3.5 CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS DE ACTINOMICETOS

Los actinomicetos aislados fueron caracterizados fenotípicamente mediante sus características morfológicas. El método morfológico consistió en la caracterización macroscópica y microscópica. Se realizó una selección macroscópica de colonias teniendo en cuenta sus características culturales de crecimiento (tamaño, forma, coloración, consistencia)⁷¹. Para las observaciones microscópicas del micelio aéreo y vegetativo se realizó siguiendo la metodología y la guía práctica para identificación de actinomicetos según esquemas de Holt et al “laminilla en plano inclinado”^{71, 72}.

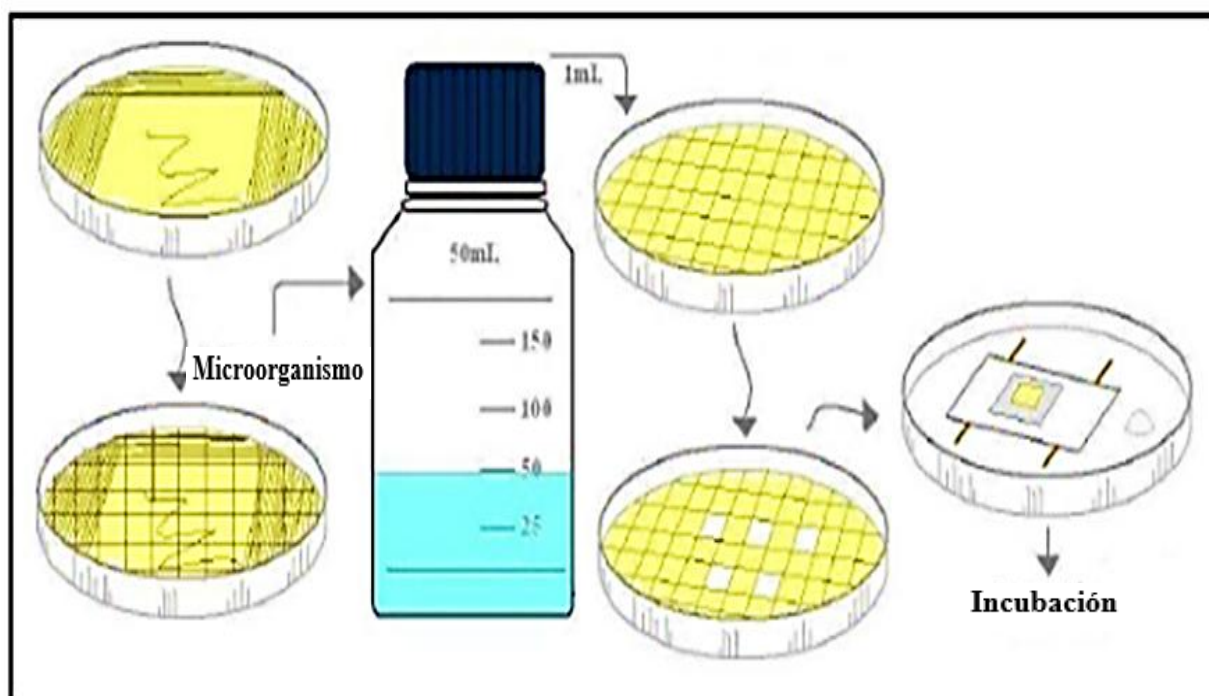
Figura 6. Esquema de “Laminilla en plano inclinado”



Para el microcultivo se utilizó la técnica de Ridell que consistió en sembrar por agotamiento el Actinomiceto en medio agar avena, una vez que se observa el crecimiento de la colonia característica macroscópicamente, se procedió a

realizar una cuadrícula en el medio con un bisturí estéril obteniendo unidades de 1 cm de lado por 3 mm de espesor y se llevaron a un frasco con 50 ml de agua destilada estéril, realizando agitación constante. Se tomó una placa Petri con medio sin inocular y se sembró 1 ml de la solución que ha sido previamente agitada y homogenizada; posteriormente se tomó un cuadro medio recién inoculado y se colocó sobre un cubre objetos soportado en dos palillos ubicados en placas Petri; este montaje requirió de hidratación suficiente por lo que se ubica una mota de algodón humedecida, en un extremo de la placa; llevando a incubación a 28°C durante 10 días⁷³. Se realizó observaciones a los días 3, 6 y 9, tiñendo con Azul de lactofenol y tinción Gram.

Figura 7. Esquema general Microcultivo⁷³.



Se observó ambas técnicas a 1000 X de los aislados siendo comparada con la morfología de actinomicetos proporcionada por el Manual Taxonómico de Bergey, que agrupa en un diagrama esquemático el crecimiento del micelio

aéreo característico de cada uno de los géneros de actinomicetos⁷⁴. Obteniendo así una identificación presuntiva a nivel de género. Las cepas aisladas se les asignó un código y se traspasó a ceparios, este código corresponde a las siglas UNSLG-LM-N° de muestra.

3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

3.6.1 CEPAS INDICADORAS: *Las cepas patógenas utilizadas en dicho ensayo fueron proporcionadas por nuestro Director de Tesis.*

- **BACTERIAS GRAM (-)**
 - *Escherichia coli* NCTC 13216
 - *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
 - *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853
- **BACTERIAS GRAM (+)**
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
 - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

3.6.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Fue realizada en el laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica.

3.6.3 MATERIALES Y PROCESOS PREVIOS A LA EVALUACIÓN

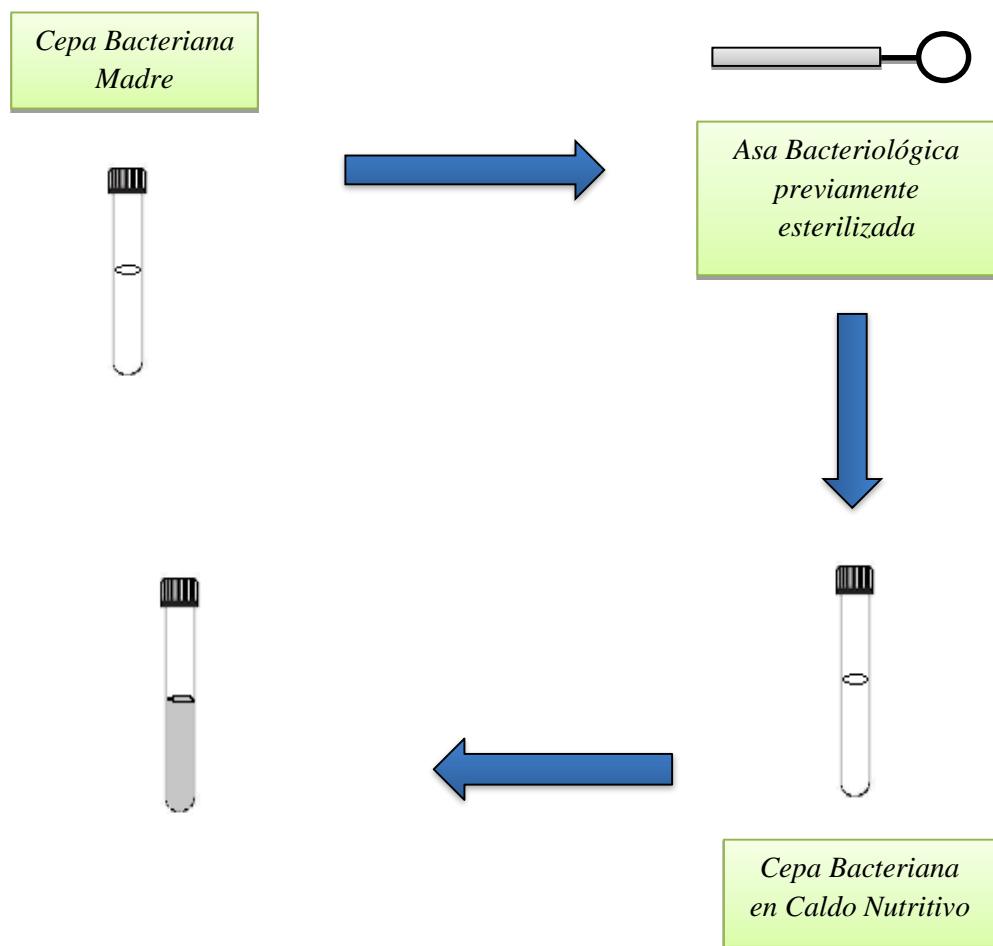
A. Preparación de medios de cultivo.

El medio de cultivo Agar Mueller Hinton se preparó según las recomendaciones del fabricante, se preparó la cantidad necesaria teniendo en cuenta la etiqueta del envase (38g /litro), luego se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. A continuación, cuando estaba a 45°C se vertió en placas estériles (15 a 20 ml) y se dejó solidificar⁷⁵.

B. Replicación de las cepas indicadores.

Las cepas indicadoras fueron reactivadas en caldo nutritivo, sembrando por agitación en tubos conteniendo 4ml de caldo nutritivo, se incubó a 37°C por 24 horas⁷⁶.

Figura 8. *Flujograma de la reactivación de las cepas indicadoras*

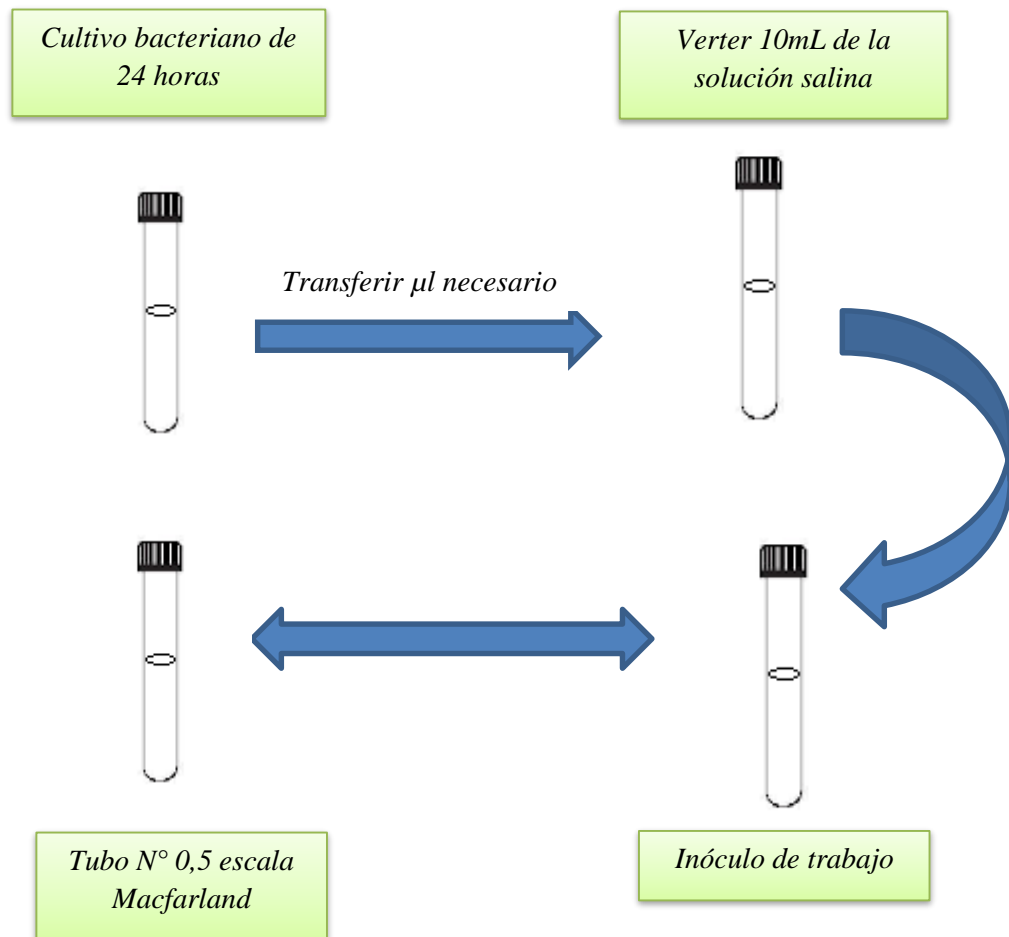


Cultivo bacteriano

C. Preparación del inóculo:

Con las cepas bacterianas reactivadas, se sembró en caldo nutritivo para luego ser incubados a 37°C durante 24 horas. A partir de estos cultivos se prepararon los inóculos transfiriendo μl necesarios del cultivo microbiano en tubos con 10 mL de solución salina fisiológica estéril hasta llegar a una turbidez equivalente al tubo del estándar de Macfarland que tiene aproximadamente 5×10^5 UFC/mL⁷⁷.

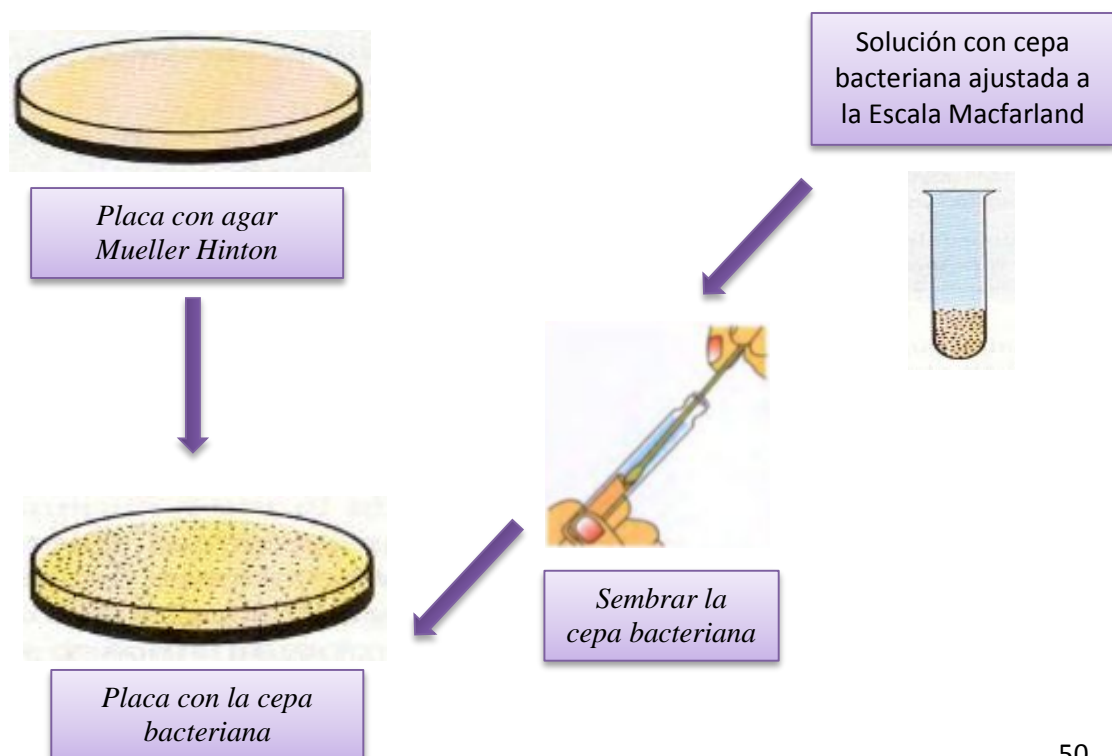
Figura 9. Flujograma de preparación del inóculo bacterianas.

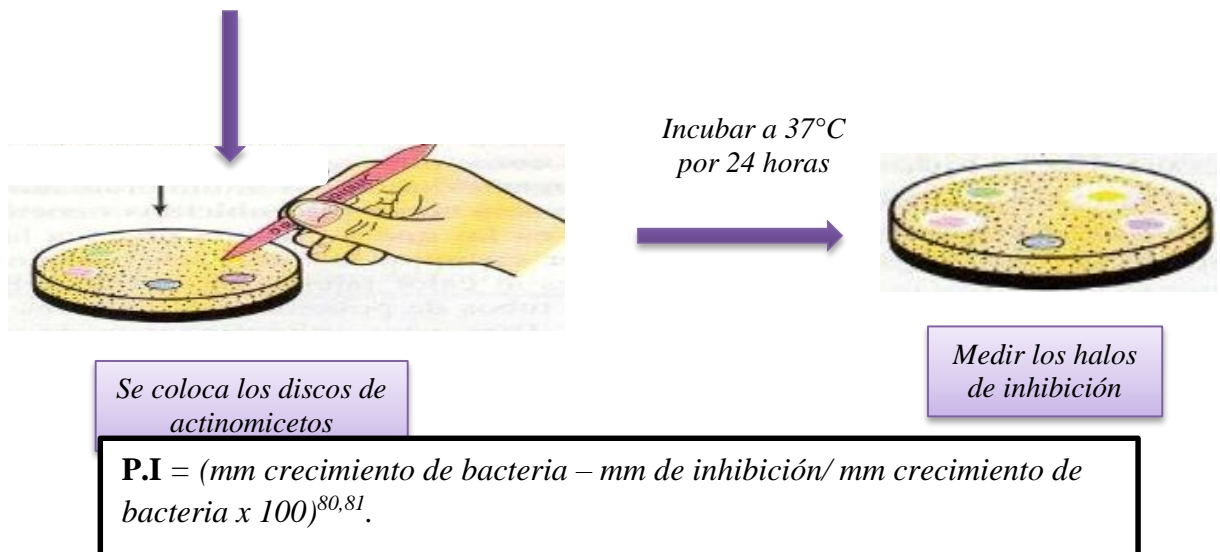


3.6.4 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

Se determinó mediante el método de difusión en disco^{78,79}, que consiste en cultivar a los actinomicetos en su medio de mejor crecimiento, agar avena por 5 días. Luego se transfieren 3 discos de cultivo de actinomiceto (11 mm de diámetro) sobre agar Mueller Hinton previamente sembrados masivamente con hisopo y agotamiento con cada cepa bacteriana de referencia ajustada a una concentración equivalente a 5×10^5 UFC/mL de la escala de McFarland: *Escherichia coli* NCTC 13216, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enteococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Se incubó a 37°C por 24 horas registrando el diámetro de la zona de inhibición en mm, todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Figura 10. Flujograma de actividad antibacteriana según método de Difusión en Disco.



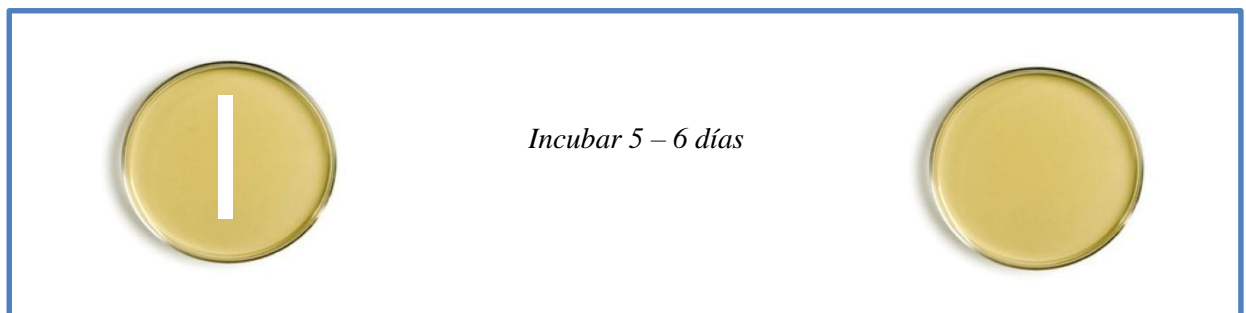


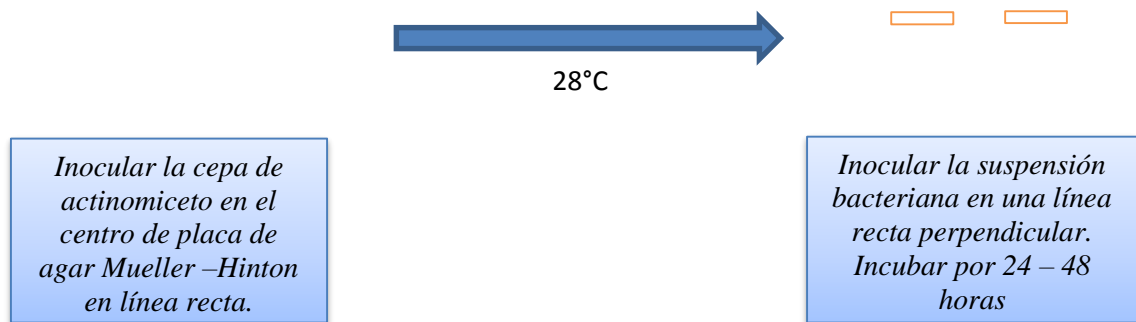
3.6.5 MÉTODO DEL ENFRENTAMIENTO DUAL

Consistió en inocular en placas con agar Mueller Hinton la cepa de actinomiceto en el centro de la placa formando una línea recta, luego se incubó de 5 a 6 días a 28°C. Transcurrido este periodo de tiempo se inoculó una suspensión bacteriana ajustada a 5×10^5 UFC/mL formando una línea recta perpendicular cuidando de no tocar el actinomiceto.

El porcentaje de inhibición se determinó después de inocular 24 horas a 28°C utilizando la siguiente fórmula:

Figura 11. *Esquema de Enfrentamiento dual*





3.7 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL AGUA

3.7.1 DETERMINACIÓN DEL pH – MÉTODO DE PRUEBA (NMX – AA-008-1980)

El método se fundamenta en la existencia de una diferencia de potencial entre las dos caras de una membrana de vidrio, expuestas a disoluciones acuosas que difieren en su valor de pH. En primera aproximación, a temperatura constante, la magnitud de esta diferencia de potencial es directamente proporcional a la diferencia de pH entre dichas disoluciones⁸².

3.7.2 DETERMINACIÓN DE DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES – MÉTODO DE PRUEBA (NMX-AA-030-1981)

Una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados con una mezcla de ácido crómico y sulfúrico de ebullición. La muestra se coloca a reflujo en una disolución de ácido fuerte con un exceso conocido de dicromato de potasio. Después de la digestión, el dicromato no reducido se mide por titulación o espectrofotométricamente para determinar la cantidad de

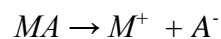
dicromato consumido y calcular la materia oxidable en términos de oxígeno equivalente⁸³.

3.7.3 DETERMINACIÓN DE OXÍGENO DISUELTOS EN AGUAS NATURALES – MÉTODO DE PRUEBA (NMX-AA-012-1980)

En el método electrométrico los electrodos de membrana sensibles al oxígeno, ya sean galvánicos o polarizados están constituidos por dos electrodos de metal en contacto con un electrolito soporte, separado de la disolución de muestra por medio de una membrana selectiva. En el cátodo, que usualmente es oro o platino, ocurre la reducción del oxígeno mientras que en el ánodo ocurre la oxidación del metal (plata o plomo). La diferencia básica entre el sistema galvánico y el polarizado es que en el primero la reacción en el electrodo ocurre espontáneamente, mientras que en el segundo es necesario aplicar un potencial externo para polarizar el electrodo indicador⁸⁴.

3.7.4. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELECTROLÍTICA - MÉTODO DE PRUEBA (NMX-AA-093-1984)

Este método se basa en la propiedad que adquiere el agua de conducir la corriente eléctrica cuando tiene iones disueltos. La conducción de la corriente eléctrica en agua, puede explicarse por medio de la disociación electrolítica. Cuando se disuelve en agua un ácido, una base o una sal, una porción se disocia en iones positivos y otra en negativos



Los iones se mueven independientemente y se dirigen a los electrodos de carga opuesta mediante la aplicación de un campo eléctrico. La cantidad de moléculas que se han disociado depende de la concentración de la solución. Las soluciones, al igual que los conductores metálicos obedecen a la Ley de Ohm, excepto en voltajes muy elevados y corrientes de frecuencia muy altas⁸⁵.

3.7.5 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA (NMX-AA- 007-1980)

El principio se basa en las propiedades de la materia de dilatarse o contraerse con los cambios de temperatura o propiedades eléctricas y físicas de los materiales con los que se realizará la medición; estas propiedades son siempre las mismas para una temperatura dada lo que permite graduar los instrumentos de medición. La temperatura se mide con un instrumento debidamente calibrado y debe efectuarse en el lugar de muestreo⁸⁶.

CAPÍTULO IV

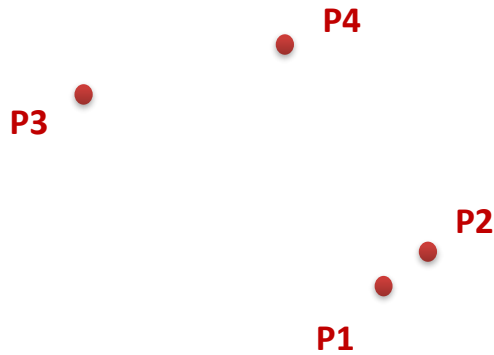
RESULTADOS

4.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE PUNTOS DE MUESTREO

De acuerdo al sistema de información geográfica (Google Earth®) se realizó el mapa geográfico de muestras, donde se indica los seis puntos de muestreo en los que fueron colectadas las muestras de la Laguna Morón; cada uno de estos puntos están denotados por un círculo de color rojo.

Figura 12. Localización de los puntos de muestreo





4.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ACTINOMICETOS:

Se obtuvieron 6 muestras y según la metodología explicada en el capítulo general de Materiales y Métodos, se identifican y aíslan 26 posibles cepas de actinomicetos. Una vez realizada las réplicas correspondientes de cada colonia en Medio Agar avena hasta lograr un cultivo puro, se evaluaron macroscópica y microscópicamente con el fin de establecer cuáles de estas cepas cumplen con características de Actinomicetos.

4.2.1 Identificación Macroscópica:

La caracterización macroscópica de las 26 posibles cepas de actinomicetos se realizó teniendo en cuenta la textura de las colonias, la coloración del micelio aéreo y de sustrato, la forma, el tamaño y/o la producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Una de las características representativas de este grupo

microbiano es el olor a suelo húmedo, debido a la capacidad de producción de geosmina; estas características fueron determinantes para su identificación.

A continuación, se presenta la descripción de las características macroscópica de las 26 posibles cepas de actinomicetos.

Tabla 5. *Características macroscópicas de las cepas aisladas de posibles actinomicetos*

CEPA CODIFICADA	CARACTERÍSTICAS
1.- UNSLG P₁ 10³	<i>Colonia color blanca yeyosa, borde grisáceo oscuro rugosa irregulares.</i>
1.1.- UNSLG P₁ 10³	<i>Colonia de color grisáceo oscuro, borde rugoso grisáceo blanquecino irregular.</i>
2.- UNSLG P₁ 10⁴	<i>Colonia de color grisáceo oscuro cremoso, borde rugoso grisáceo blanquecino irregular</i>
3.- UNSLG P₁ 10⁵	<i>Colonia de color grisáceo oscuro cremoso, borde rugoso grisáceo blanquecino irregular.</i>
4.- UNSLG P₂ 10⁴	<i>Colonia de color grisáceo costrosa pulverulento, borde irregular.</i>
4.1.- UNSLG P₂ 10⁴	<i>Colonia de color grisáceo, con borde irregular.</i>
4.2.- UNSLG P₂ 10⁴	<i>Colonia de color grisáceo oscuro circular costrosa pulverulento borde blanquecino rugosa.</i>
5.- UNSLG P₂ 10⁵	<i>Colonia de color grisáceo oscuro cremoso, borde rugoso grisáceo blanquecino irregular.</i>
5.1.- UNSLG P₂ 10⁵	<i>Colonia de color grisáceo oscuro cremoso, borde rugoso grisáceo blanquecino irregular.</i>
5.2.- UNSLG P₂ 10⁵	<i>Colonia de color grisáceo oscuro circular de borde blanco rugoso cremoso irregular.</i>

6.- UNSLG P₃ 10³	<i>Colonia de color grisáceo claro costrosa circular pulverulenta de borde rugosa irregular.</i>
6.1.- UNSLG P₃ 10³	<i>Colonia de color grisáceo bordes irregulares.</i>
6.2.- UNSLG P₃ 10³	<i>Colonia de color grisáceo oscuro circular costrosa pulverulento borde blanquecino rugosa.</i>
7.- UNSLG P₃ 10⁴	<i>Colonia color blanca yeyosa pulverulenta, borde grisáceo oscuro rugosa irregulares.</i>
7.1.- UNSLG P₃ 10⁴	<i>Colonia color grisáceo oscuro cremoso borde irregular rugoso.</i>
8.- UNSLG P₄ 10⁴	<i>Colonia de color grisáceo claro, borde rugoso irregulares</i>
9.- UNSLG P₄ 10⁴	<i>Colonia de color grisáceo oscuro cremoso de borde irregular rugosa.</i>
9.1.- UNSLG P₄ 10⁴	<i>Colonia de color grisáceo claro, borde rugoso irregulares</i>
10.- UNSLG P₄ 10⁵	<i>Colonia de color grisáceo oscuro cremoso, borde rugoso irregular.</i>
10.1.- UNSLG P₄ 10⁵	<i>Colonia de color grisáceo claro, borde rugoso irregulares</i>
11.- UNSLG P₅ 10³	<i>Colonia de color grisáceo oscuro de borde irregular con puntos blanquecinos.</i>
12.- UNSLG P₅ 10⁵	<i>Colonia color grisáceo claro cremoso, borde rugoso irregular.</i>
12.1.- UNSLG P₅ 10⁵	<i>Colonia de color grisáceo oscuro, borde irregular con puntos blanquecinos.</i>
13.- UNSLG P₆ 10²	<i>Colonia de color grisáceo oscuro, borde rugoso irregular</i>
14.- UNSLG P₆ 10⁴	<i>Colonia de color grisáceo claro, borde rugoso irregular</i>

15.- UNSLG P₆ 10⁵

Colonia de color grisáceo oscuro, borde rugoso irregulares

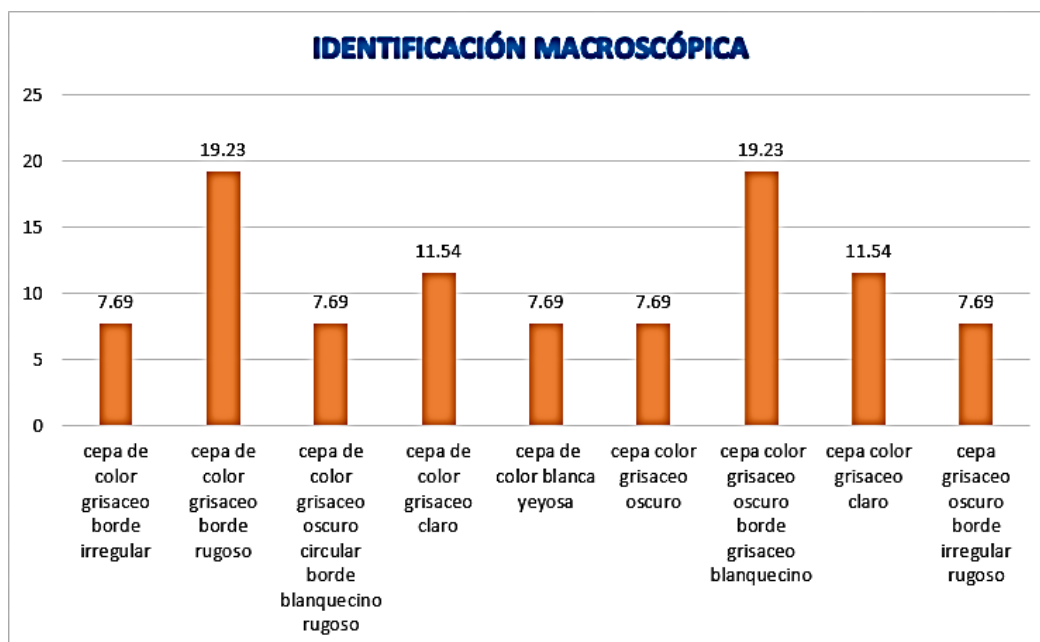
* P_x: Punto de muestreo

* 10^x: Escala de disolución

* La repetición de algunas codificaciones se debe a que el sembrado de las muestras (los sedimentos acuosos) se realizaron por triplicado en cada escala de las disoluciones (10³, 10⁴ y 10⁵) y solo se representan los resultados positivos a la presencia de posibles actinomicetos.

Teniendo 2 cepas de color grisáceo borde irregular (7,69%), 5 cepas de color grisáceo borde rugoso (19,23%), 2 cepas de color grisáceo oscuro circular borde blanquecino rugosa (7,69%), 3 cepas de color grisáceo claro (11,54%), 2 cepas de color blanca yeyosa (7,69%), 2 color grisáceo oscuro (7,69%), 5 cepas de color grisáceo oscuro borde grisáceo blanquecino (19,23%), 3 cepas color grisáceo claro (11,54%), 2 cepas color grisáceo oscuro borde irregular rugoso (7,69%). Para identificar los posibles géneros, de dichos actinomicetos, se procedió a evaluarlos microscópicamente. Asimismo, la pigmentación al reverso de las

Figura 13. Característica Macroscópica de las cepas aisladas de



De las 26 posibles cepas de actinomicetos, 13 fueron descartadas, ya que adicionalmente según las pruebas microscópicas no eran cocos Gram positivos, ni presentaban estructuras miceliales.

Así, se determinó que 9 de las 26 colonias aisladas en Agar Avena podían ser posibles actinomicetos. Y para confirmar tal resultado, se llevó a cabo una identificación microscópica de las 9 posibles cepas de actinomicetos.

4.2.2 Identificación Microscópica:

Bajo las consideraciones metodológicas establecidas, se obtuvo la identificación de los actinomicetos en criterios microscópicos siguiendo las recomendaciones del Manual taxonómico de Bergey, agrupándolos en un diagrama esquemático del crecimiento del micelio aéreo característico de cada uno de los géneros de Actinomicetos, y su morfología en forma de coco Gram positivos⁶¹.

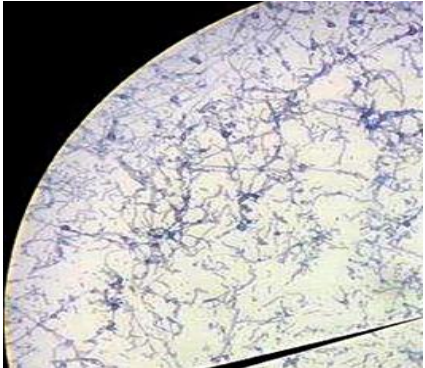
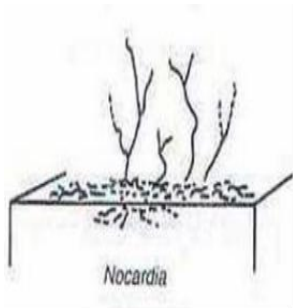
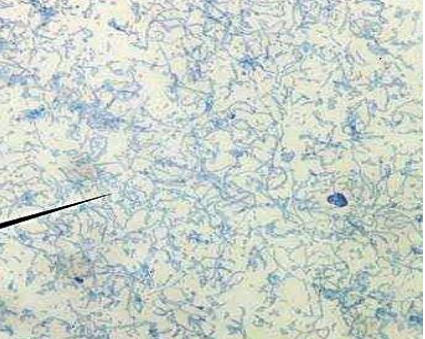
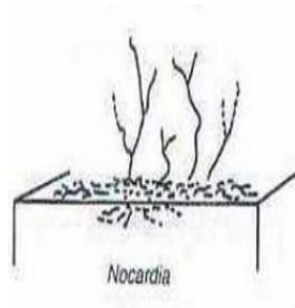
De las 26 cepas consideradas actinomicetos, se identificó 9 grupos teniendo en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas según las pruebas de identificación.

En tabla N. 6 se recopilan los 9 nueve géneros identificados por medio de la clave de Bergey, junto a las características más representativas, entre los que se encuentran el género Nocardia, situación de esperarse ya que este género se encuentra entre los más abundantes de la biota actinomítica del suelo, y el género Streptomyces, que es uno de los mejor reconocidos del orden completo en la naturaleza, especialmente en el suelo y porque alberga a un gran número de los productos más importantes de antibióticos y otros metabolitos secundarios⁸⁷.

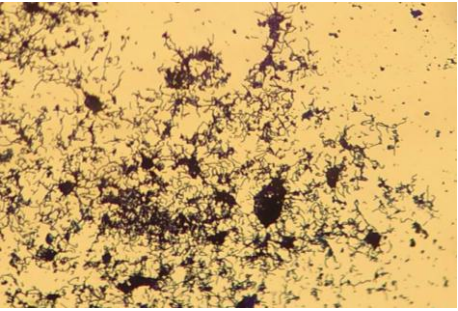
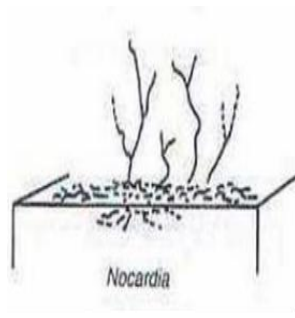
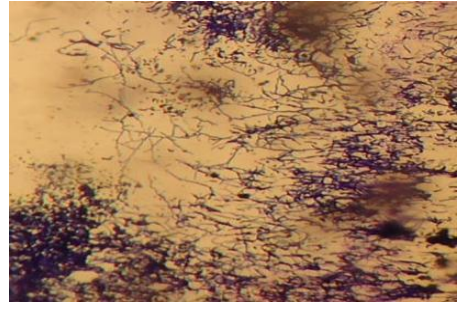
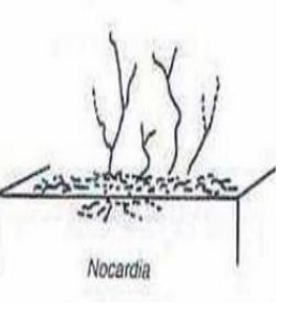
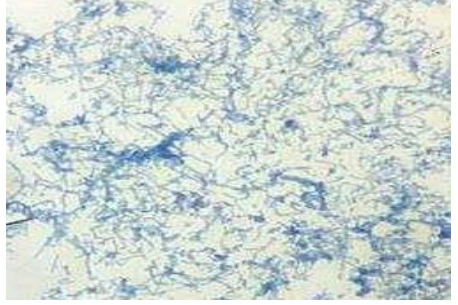
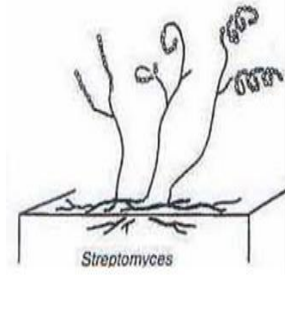
Una vez identificadas las cepas de actinomicetos a nivel de género, se realizó la actividad antibacteriana con las cepas de referencia.


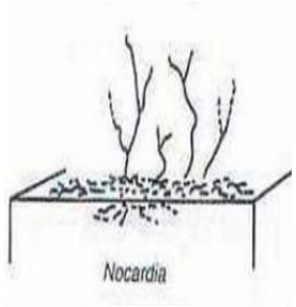

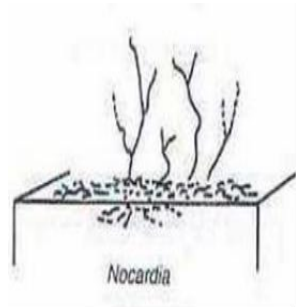
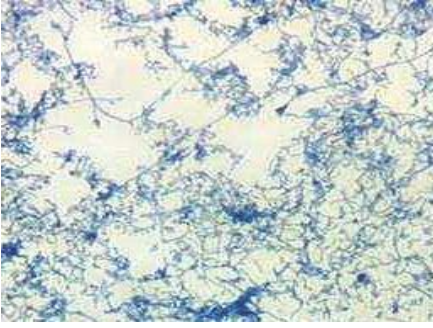
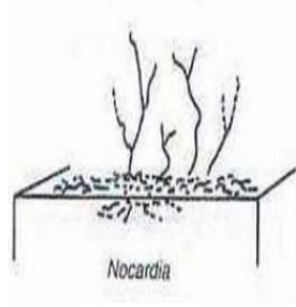
4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

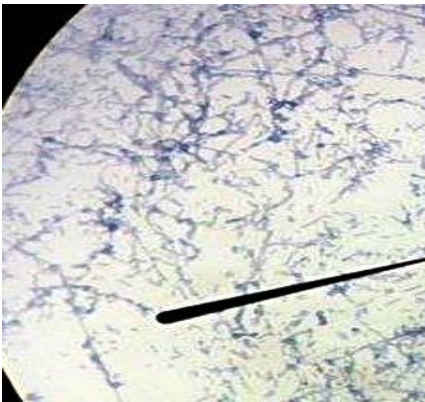
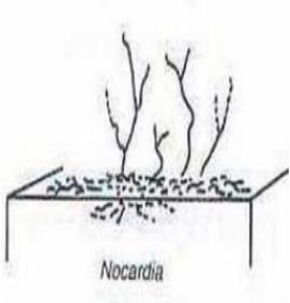
Tabla 6. Identificación microscópica de las cepas de actinomicetos

Cepa	Identificación Microscópica	Manual Taxonómico de Bergey	Género
	T Lactofenol / T Gram		
UNSLG P ₂ 10 ⁴	 <p><i>Crecimiento micelar vegetativo, filamentos fragmentados, no hay presencia de conidios, ramificaciones pronunciadas.</i></p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	NOCARDIA
U UNSLG P ₂ 10 ⁴	 <p><i>Crecimiento micelar vegetativo ramificado, filamento profundo no fragmentados, no hay presencia de conidios.</i></p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	NOCARDIA

De las 9 cepas de actinomicetos aisladas, 2 (22,2 %) tuvieron una ligera actividad antibacteriana. El detalle de la actividad antibacteriana de las 9 cepas de actinomicetos sobre las 6 cepas de referencia se muestra en la tabla N. 6. Los actinomicetos que lograron mostrar una ligera actividad antibacteriana fueron *Streptomyces* sp. (UNSLG P₁ 10⁴) y *Nocardia* sp. (UNSLG P₂ 10⁴), los cuales solo actuaron ligeramente contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Cabe señalar que

<p>UNSLG P₁ 10³</p>	 <p><i>Crecimiento micelar vegetativo, filamentos fragmentados, no hay presencia de conidios, ramificaciones pronunciadas.</i></p>	 <p>Nocardia</p>	<p>NOCARDIA</p>
<p>UNSLG P₂ 10⁵</p>	 <p><i>Crecimiento micelar vegetativo ramificado, filamento profundo no fragmentados, no hay presencia de conidios.</i></p>	 <p>Nocardia</p>	<p>NOCARDIA</p>
<p>UNSLG P₁ 10⁴</p>	 <p><i>Crecimiento micelar vegetativo, filamento profundo septados, los extremos de las ramificaciones se encuentran en forma espiralada.</i></p>	 <p>Streptomyces</p>	<p>STREPTOMYCES</p>

<p style="text-align: center;">UNSLG P₅ 10⁵</p>	 <p style="text-align: center;"><i>Crecimiento micelar vegetativo ramificado, filamentos no fragmentados, no hay presencia de conidios.</i></p>	 <p style="text-align: center;"><i>Nocardia</i></p>	<p style="text-align: center;">NOCARDIA</p>
<p style="text-align: center;">UNSLG P₆ 10⁵</p>	 <p style="text-align: center;"><i>Crecimiento micelar vegetativo ramificado, filamentos no fragmentados, no hay presencia de conidios.</i></p>	 <p style="text-align: center;"><i>Nocardia</i></p>	<p style="text-align: center;">NOCARDIA</p>
<p style="text-align: center;">UNSLG P₁ 10⁵</p>	 <p style="text-align: center;"><i>Crecimiento micelar vegetativo, presencia de conidios, colonia filamentososa.</i></p>	 <p style="text-align: center;"><i>Nocardia</i></p>	<p style="text-align: center;">NOCARDIA</p>

UNSLG P₅ 10⁵	 <p><i>Crecimiento micelar vegetativo, presencia de conidios, colonia filamentosa.</i></p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	NOCARDIA
---	---	---	-----------------

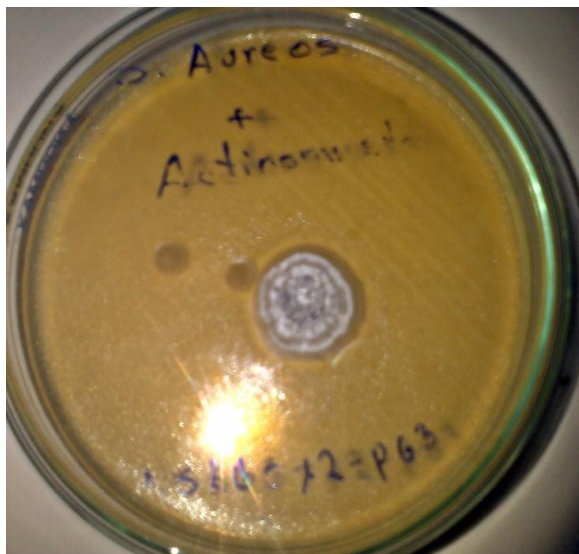
las medidas de los halos de inhibición frente a las cepas de referencia estuvieron muy por debajo de los controles positivos validados por el Instituto Nacional de Salud (INS).

Tabla 7. Actividad antibacteriana de 9 actinomicetos contra cepas de referencia.

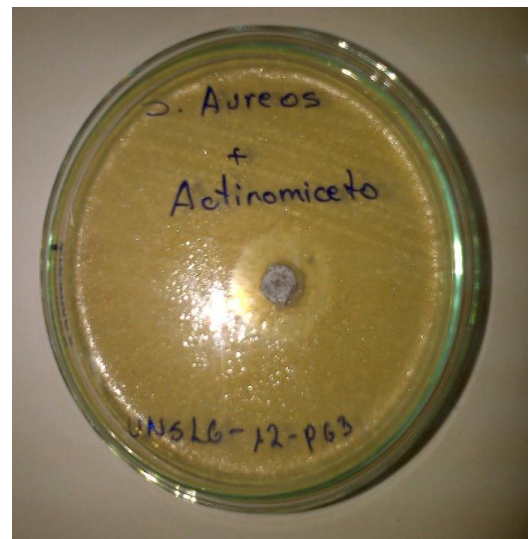
	Cepa de Actinomiceto	Cepa de Referencia					
		<i>E. coli</i>	<i>S.</i>	<i>P.</i>	<i>S.</i>	<i>E.</i>	<i>S.</i>
		<i>NCTC 13216</i>	<i>typhimurium ATCC 14028</i>	<i>aeruginosa ATCC 27853</i>	<i>aureus ATCC 25923</i>	<i>faecalis ATCC 29212</i>	<i>epidermidis ATCC 12228</i>
1	UNSLG P₂ 10⁴	0	0	0	0	0	0
2	UNSLG P₂ 10⁴	0	0	0	5	0	0
3	UNSLG P₁ 10³	0	0	0	0	0	0
4	UNSLG P₂ 10⁵	0	0	0	0	0	0
5	UNSLG P₁ 10⁴	0	0	0	11	0	0
6	UNSLG P₅ 10⁵	0	0	0	0	0	0
7	UNSLG P₆ 10⁵	0	0	0	0	0	0
8	UNSLG P₁ 10⁵	0	0	0	0	0	0

9	UNSLG P ₅ 10 ⁵	0	0	0	0	0	0
---	--------------------------------------	---	---	---	---	---	---

La sensibilidad de la cepa indicadora frente a la cepa de actinomiceto se expresa en diámetro del halo de inhibición (mm).



5 mm



11 mm

Figura 14. Actividad antibacteriana de cepas de actinomicetos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.4. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL AGUA

Es indiscutible la preponderancia del agua para la vida en la tierra, y más aun teniendo una vital importancia en los procesos metabólicos⁸⁸.

Precisamente los factores fisicoquímicos del agua de la Laguna Morón han sido ideales para el desarrollo de los procesos metabólicos de bacterias Gram positivas, siendo en este caso los actinomicetos. Para los actinomicetos el status de materia orgánica, pH, temperatura, y oxígeno son los determinantes ecológicos principales. Las regiones climáticas cálidas son más favorables para una extensa flora de actinomicetos, los ambientes cuyo pH comprenden entre 5 y 9 con una neutralidad cercana a la óptima y altas concentraciones de O₂.^{89, 24}

Tabla 8. *Análisis fisicoquímicos del agua de la Laguna Morón, distrito de Bernales, provincia de Pisco.*

<i>PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS</i>					
<i>Muestra replicas</i>	Temperatura °C	pH	Conductividad μS/cm ³ 25°C	DQO ppm	Oxígeno disuelto ppm
1	28	8,43	130,8	2,8	8,8
2	28	8,44	131,3	2,8	8,9
3	28	8,44	131,0	2,7	8,6
Promedio		8,44	131,0	2,8	8,8

DISCUSIÓN

En la actualidad, la multiresistencia antibiótica pone en peligro el tratamiento de un número creciente de enfermedades infecciosas. Gracias a la participación de actinomicetos productores de metabolitos bioactivos tipo antibiótico es posible contrarrestar a algunos de estos patógenos emergentes. Así mismo, estos microorganismos abundan en lugares cálidos, en tierra, agua, lagos, lagunas, mares y sedimentos acuosos. Las investigaciones que se han realizado en el Perú han evidenciado su presencia, aislándolos de ambientes marinos a partir de sedimentos acuosos como el de León y col., y en ambientes dulceacuícolas en la región de Huancavelica como el de Olaguibel V., Tello M., Velásquez Ll. y col⁹⁰.

Pero aun así son verdaderamente escasas a diferencia de múltiples investigaciones internacionales como la de Leiva¹⁰ y Jiang y Xu⁹¹.

En este trabajo se logró obtener generosos resultados de 2 actinomicetos aislados a partir de sedimentos acuosos de la Laguna Morón perteneciente al distrito de Bernales, provincia de Pisco, departamento de Ica. Se obtuvo un total de 9 cepas de actinomicetos, siendo el medio de cultivo preferencial de mayor crecimiento en agar

avena, teniendo una concordancia con trabajos internacionales como el de Salazar⁹², que ya trabajaron con este medio selectivo aislando 29 cepas de actinomicetos, situación que difiere en resultados como León, que aisló 29 cepas en agar marino y agar czapeck⁴.

Así también en el presente estudio se pudo observar una variedad morfológica de colonias de actinomicetos, siendo las más frecuentes las circulares con borde rugoso y las colonias de bordes muy irregulares, colonias blanco – grisácea pulverulentas y sin pigmentación en superficie, predominaron sobre las demás variedades de colonias sin embargo, la pigmentación al reverso de cada colonia fue variable entre el color marrón, amarillo y rojizo. Este resultado concuerda con el estudio realizado por León y col. al obtener una variedad morfológica de actinomicetos, donde predominó las características macroscópicas ya descritas⁴.

Por otro lado, en la identificación microscópica se recopiló los géneros identificados por medio del Manual de Bergey²⁵, junto a las características más representativas, entre los que se encuentran el género *Nocardia*, situación de esperarse ya que este género se encuentra entre los más abundantes de la biota actinomítica y el género *Streptomyces*, que es uno de los mejor reconocidos del orden completo de Actinomycetales debido a su amplia distribución en la naturaleza, especialmente en el suelo y sedimentos acuosos⁸⁷. Además, porque alberga a un gran número de los productores más importantes de antibióticos y otros metabolitos secundarios.

Este resultado concuerda con lo presentado por trabajos anteriores como Gl. cardona y col⁹³, L-H.xu y Jiang⁹², quienes reportaron que en la mayoría de estudios con actinomicetos del suelo, se han aislado cerca de 20 géneros, siendo los *Streptomyces* los más numerosos, representativos y dominantes dentro de la comunidad.

Estos datos resultan muy interesantes, ya que en nuestros ensayos de antagonismo las únicas cepas que mostraron efectividad fueron las cepas **UNSLG P₁ 10⁴** identificada como *Streptomyces* sp. y la **UNSLG P₂ 10⁴** identificada como *Nocardia* sp. frente a *S. aureus* ATCC 25923 con un halo de inhibición de 11 mm y 5 mm respectivamente. Así

mismo, los parámetros físico – químicos constituyeron un factor ideal para su crecimiento y desarrollo de los actinomicetos, ya que según estudios generales demuestran que el pH correcto de viabilidad es de 5 a 9, y una carga sustancial de oxígeno²⁴.

Si bien es cierto de que los resultados obtenidos no son óptimos en comparación con los referidos en el control positivo según el último reporte del INS Laboratorio de IRAs e IHH. CNSP ², sin embargo este trabajo es un referente importante para continuar trabajando con las cepas y también probar las otras aunque no presente actividad antimicrobiana posiblemente pueden obtener otro tipo de uso en los diversos campos de la biotecnología farmacéutica para las búsquedas de nuevos metabolitos bioactivos capaces de inhibir patógenos resistentes y multiresistentes.

CONCLUSIONES

- 1. Se aislaron 9 cepas de actinomicetos a partir de sedimentos acuosos de la Laguna Morón – Pisco donde se evaluó su actividad antibacteriana, siendo una fuente promisorio de cepas con capacidad selectiva en inhibir patógenos tipificados de importancia clínica.*
- 2. Se logró identificar las cepas de actinomicetos como Streptomyces sp. UNSLG P₁ 10⁴ que presentó mayor capacidad de inhibición, y Nocardia sp. UNSLG P₂ 10⁴ presentando un ligero antagonismo, ambos frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923.*

RECOMENDACIONES

1. *Seguir con las investigaciones en la Laguna Morón, donde ya se conoce que hay fuente promisoría de actinomicetos los cuales pueden tener no sólo capacidad de antagonismo ante patógenos, sino también en la degradación de metales pesados, contribución en el fortalecimiento de sustancias bioactivas en el suelo, entre otras propiedades que se le atribuye al reino de los actinomicetos.*
2. *Identificar los metabolitos bioactivos de actinomicetos que puedan tener capacidades de degradación, antagonismo o fortalecimiento de suelo para cultivos.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Labarca LJ, Araos BR. Resistencia antimicrobiana: problema en aumento y soluciones escasas. *Rev Chil Infect* 2009; 26 (Supl 1): 8-9
2. Laboratorio de IRAs e IIH. CNSP. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario en Lima – 2012. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Disponible en:
http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/cnsp_resanti_informesdevigilancia/INFORME_RESISTENCIA_ANTIMICROBIANA_2012.pdf
3. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett J. Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42, 657-668.
4. León J, Aponte JJ, Rojas R, Cuadra LD, Ayala N, Tomás G, Guerrero M. Estudio de Actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes

- y enterococcus faecalis vancomicina resistentes. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2011; 28(2): 237-46.*
5. Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. Isolation and characterization of potential antibiotic producing Actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(6): 426-435
 6. De la Rosa GS, Gamboa AMM. Microorganismos acuáticos: una familia por visitar. *Ciencia Ergo Sum* 2004; Pp.186-190.
 7. Cwala Z, Igbinsola EO, Okoh AI. Assessment of antibiotics production potentials in four Actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. *African J Pharm and Pharmacol* February 2011; 5(2), 118-124.
Disponibile en: <http://www.academicjournals.org/ajpp/>
 8. Hernández Arroyo M.M. Determinación de la diversidad y abundancia de actinomicetos de suelos en ecosistemas representativos en el estado de Hidalgo. Instituto Politécnico Nacional. Tepetitla de Lardizabal, tlaxcala.2009
 9. Zhang L, An R, Wang J, Sun N, Zhung S, Hu J. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Curr. Opin. Microbio.* 2005, 8, 276-281.
 10. Leiva S, Yáñez M, Zaror L, Rodríguez H, García QH. Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 151-159
 11. Rifaat HM. The biodiversity of actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. *J.Mediter. Ecol.* 2003, 4, 5-7.
 12. Kunin CM. Resistance to antimicrobial drugs a worlwide calamity. *Ann Int Med* 1993; 118: 557-61.
 13. Prescott LM, Harley JP y Klein DA. *Microbiología.* 2004. Traducción al español 2.por C. Gamazo de la Rasilla y Lasa U. I., 5ª ed. (1240 pp.).
 14. Madigan, Michael T., y Brock, Thomas D. *Biología de microorganismos* 2009, Brock *biología de microorganismos*, 12ª ed. Prentice-Hall International Inc., New Jersey.

15. Podust L, Bach H, Kim Y, Lamb D, Arase M, Sherman D. Comparison of the 1.85 Å structure of CYP154A1 from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with the closely related CYP154C1 and CYPs from antibiotic biosynthetic pathways. *Protein Science*. 2004; 13:255–68
16. Barbosa TM, Levy SB. “Antibiotic Use and Resistance: What Lies Beneath”. *APUA Newsletter. Alliance for the prudent use of antibiotics*. 2001; 19(1):1-3.
17. Bills G, A. Dombrowski; F. Peláez; J. Polishook y Z. An. “Recent and Future Discoveries of Pharmacologically Active Metabolites from Tropical Fungi”, en Watling, R.; J. C. Frankland; A. M. Ainsworth; S. Isaac y C. H. Robinson. *Tropical Mycology*. 2002. Vol. 2, Micromycetes. CAB International, Londres. Pp. 165-195.
18. Honorio y col. Aislamiento de actinomicetos presentes en sedimentos marinos de Loreto, Baja California Sur y su evaluación como posible fuente de moléculas antimicrobianas. 2015.
19. León J, Liza L, Soto I, Cuadra DL, Patiño L, Zerpa R. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Rev. Perú. biol*. 2007; 14(2): 259-270.
20. Srinivasan, M. C., Laxman, R. S., and Deshpande, M. V. Physiology and nutrition aspects of actinomycetes An overview. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 1991; 7, 171–184.
21. Ezziayyani, M., Pérez, C., Requena, M., Rubio, L., Candela, M. Biocontrol por *Streptomyces rochei* – Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*capsicum annum* L.) Causada por *Phytophthora capsici*. 2004. *Anales de biología* . 26 :69 – 78.
22. Whitman W, Goodfellow M, Kampfer P, Busse H-L, Trujillo ME, Ludwig W & Suzuki K-I *The Actinobacteria part A and B. Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology*, 2012 Vol. 5 p.pp. 33-1996. Springer New York.
23. Titus A, Pereira GN. *The role of Actinomycetes in coffee plantation ecology*. 1999-2007. Recuperado a través de: <https://ecofriendlycoffee.org/the-role-of-actinomycetes-in-coffee-plantation-ecology>. Acceso 10 de enero del 2017.

24. Franco M. *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas [tesis doctoral].Granada (AND): Granada Univ.; 2008.*
25. Bergey J, Hendricks D, Holt J. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology.* 2000. 9 ed. Philadelphia: Lippincott. Williams & Wilkins.
26. Erko Stackebrandt, Fred A. Rainey, And Naomi L. Ward-Rainey. *Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov;* 1997.
27. Mcneil MM, Brown JM. *The medically important aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. Clin Microbiol Rev.* 1994; 7(3):357-417
28. Wellington E, Williams S. *Host ranges of phages isolated to Streptomyces and other genera. Zentel Bacteriol Hygene* 1981;11:3-08
29. Anderson AS, Wellington EM. *The Taxonomy of Streptomyces and related genera.Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51 (3): 797 – 814.
30. Kitasano University. *Discover Life – Bacteria: Actinobacteria Actinomicetos.* (on line). 2007 Enero.
<http://www.discoverlife.org/mp/20o?search=Actinobacteria>
31. Serrano J, Sandoval A. *Identificación y diagnóstico de Actinomicetales Patógenos, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.* 2008; 6:158-160.
32. Berdy J. *Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics (Tokyo)* 2005. 58: 1-26.
33. Demain AL & Sanchez S. *Microbial drug discovery: 80 years of progress. Journal of Antibiotics (Tokyo)* 2009. 62: 5-16.
34. Solecka J, Zajko J, Postek M & Rajnisz A. *Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. Central European Journal of Biology* 2012. 7: 373-390
35. Leveau LY & Bouix M. *Microbiologia industrial: Los microorganismos de interes industrial.* 2000.
36. Crawford D, Lynch J, Whipps J, Ousley M. *Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. Applied and Environmental Microbiology.* 1993; 59: 3899-3905.

37. Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G & Marinelli F (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 78: 399 – 405.
38. Baltz RH & Hosted TJ. *Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes*. *TibTech*. 1996. 14: 245 – 250.
39. Evangelista MZ & MorenoEA. *Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos*. 2007. *Revista BioTecnología* 11:37-50.
40. Martin A. *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT editores. Ciudad de Mexico. 1981.
41. Kampf P. *The family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. The Prokaryotes*, 2006. Vol.3 p.pp. 538-604. Springer New York.
42. Lancini GC, Parenti F & Gallo GG; *Antibiotics : A Multidisciplinary Approach*. Plenum Press New York , NY.
43. Cordiés, L., Vázquez, A. *Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Revisión bibliográfica*. *Rev. Acta Médica*. 1990; 4.
44. Tomasz M. *Mitomycin C: Small, fast and deadly (but very selective)*. 1995. *Curr. Biol*. 2: 57 579.
45. Demain Al; *Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganism s*. *Appl. Microbiol, Biotechnol*. 1999. 52: 455 – 463.
46. Sobell H. *Actinomycin and DNA transcription*. USA. 1985. 82: 532
47. Mejía GA, Ramelli MA. *Interpretación Clínica del Laboratorio*. 7a ed. Bogotá: Editorial Médica Internacional; 2006.
48. Vidyasagar A. *What Are Bacteria?* *Revista Live Science*. 2015. [Revista Virtual]. Consultado el 02 de setiembre del 2017. Disponible en <http://www.livescience.com/51641-bacteria.html>.
49. Prats G. *Microbiología Clínica*. 1a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2005.
50. Margall, N., Domínguez, A., Prats, G., Salleras, L., “*Escherichia coli Enterohemorrágico*” *Revista Española de Salud Pública*, 1997, 71: 437-443.

51. Todar, K., "Pathogenic *E. coli*". University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology, 2008. Disponible en <http://www.textbookofbacteriology.net/>
52. Schroeder, C. M., Meng, J., Zhao, S., DeRoy, C., Torcolini, J., Zhao, C., McDermott, P. F., Wagner, D. D., Walker, R. D., White, D. G., "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans" *Emerging Infectious Diseases*, 2004; 8 (12):1409-14.
53. Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Alonso, M. P., González, E. A., and Bernárdez, M. I., "Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*" *Manual de Microbiología Veterinaria*, S. Vadillo, S. Píriz and E. Mateos, 2002, capítulo 21: 301-325
54. Calva E. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: De la biología molecular a la salud pública. Instituto de Biotecnología, UNAM. [en línea]. [Fecha de acceso 28 de Julio del 2016].
Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/25>.
55. *Salmonella* (non-typhoidal). Fact sheet N°139. WHO; 2013. [Fecha de acceso 17 de Diciembre del 2016]. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/index.html>
56. Madigan M., Martinko J., Parker J. *Brock Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid, España: Pearson Educación S.A., 2004 XXV+1011 (p. 301, 369, 370, 375, 721).
57. Malhotra S. et al. Proteome análisis of the effect of mucoid conversión on global protein expresión in *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 shows induction of the disulfide bond isomerase, DsbA. *J Bacteriol* 2000; 182:6999-7006.
58. Porrel L. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing Metallo- β -lactamase and Its plasmido-ahd integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Ag Chemoter* 2000; 44:891-897.

59. Sánchez A. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* Revista Española de Quimioterapia 2004; 17:336-340.
60. Ramírez SM. Evaluación de la Actividad antibacteriana del extracto de acetato de etilo obtenido de tallos de la especie *Baccharis tricuneata* (L.f.) Pers “Taya” frente a bacterias patógenas [Tesis]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; 2013.
61. Todar K. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Disease. Online Textbook of Bacteriology. Madison. 2008. [on line]. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>
62. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 2006; 32:104-9.
63. Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G. Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. *Int J Artif Organs.* 2006; 29:402-6.
64. Garcia C, Pardo J, Seas C. Bacteriemia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso. *Rev. Medica Herediana.* 2003; 14(4): 221-223.
65. Canter L. *Manual de evaluación de impacto ambiental. Tecnicas para la elaboración de estudios de impacto* Universidad de Oklahoma. 2000. Mc Graw Hill. Inc US. 835 p.
66. Antonio Aznar Jiménez. Instituto Tecnológico de Química y Materiales “Álvaro Alonso Barba”. Universidad Carlos III. Avd. de la Universidad 30. 28911-Leganés. Madrid. Determinación de los parámetros fisico-químicos de calidad de las aguas.
67. Proyecto Rio Henaees. <http://riohenares.org/index.php/rio-henares/calidad-de-las-aguas/38-temperatura.html>

68. Pisano MA, Sonner MJ, López M. Application of pretrataments for the isolation of bioactive Actinomycetes from marine sediments. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 1986; 25:285-288.
69. Takizawa W, Colwell RR, Hill RT. Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59(4): 997-1002
70. Mancilla CA. Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la microbiota bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia- Universidad Austral De Chile-Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias. Valdivia 2003.
71. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams SP. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 9^{ed}. Williams & Wilkins. Baltimore. 1994.
72. Corrales DF, García JE, Serrano JA. Identificación y producción de antibiosis por Actinomycetales aislados del suelo. *Boletín SYM* 17, 13-18. 1997.
73. Serna M. y Guzmán J.D. Una Mirada a las Magnoliáceas Colombianas. *Revista Politecnica ISSN 1900-2351, año 6, Numero 11, 2010.*
74. Rodríguez R. Evaluación de Etapas del proceso productivo de un Bioinsumo dirigido a la degradación de materiales orgánicos y regulación sanitaria de cultivos. Universidad Católica de Manizales. Manizales, Colombia 2010.
75. Laboratorio conda's Mueller Hinton
https://www.condalab.com/uploads/media/1058_AGAR_MUELLER_HINTON_REv_01_Febrero_2014_01.pdf
76. Laboratorio británico Caldo nutritivo
<http://www.britanialab.com/productos/B02123%20REV%2001-NUTRITIVO%20CALDO.pdf>.
77. Mayer B y Miguel G. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica KIRBY-BAUER 1984.
78. Bauer AW, Kirby W, Sherrus J, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology,* 1966; 45: 493-496.

79. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved Standard. Eighth edition. M07-A8. Vol. 29 (2): 1-65, 2009.*
80. Medina H. y Evangelista Z. *Aislamiento y búsqueda de actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana. UNA CARTA TECNOCENCIA. 2011.*
81. Jayasinghe D. y Parkinson D. *Applied soil ecology. 38: 109 – 118, 2008.*
82. CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). *Normas Mexicanas “Determinación del ph – Método de Prueba” (CANCELA A LA NMX – AA-008-1980).*
83. CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). *Normas Mexicanas “Determinación de demanda química de oxígeno en aguas naturales – método de prueba” (CANCELA A LA NMX – AA-030-1981).*
84. CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). *Normas Mexicanas “determinación de oxígeno disueltos en aguas naturales – método de prueba” (CANCELA A LA NMX – AA-012-1980).*
85. CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). *Normas Mexicanas “determinación de la conductividad electrolítica - método de prueba (CANCELA A LA NMX – AA-093-1984).*
86. CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). *Normas Mexicanas “determinación de la temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba” (CANCELA A LA NMX – AA-007-198).*
87. P. Corredor, E. Andrade, J. Tohme, M. Duque y C. Florez. *Abundancia y diversidad de las comunidades de Streptomyces en seis coberturas vegetales de la franja cafetera del Quindío, Colombia. Acta Biologica Colombiana Vol 5 N° 2, 2000, pp 59*
88. Henze, M., Grady Jr., C. P. L., Gujer, W., Marais, G. R., Matsuo, T., *Activated Sludge Model n° . Scientific and Thecnical Report No. 1, 1987, IAWPRC, London.*

89. KUSTER, E. (1976)._ *Ecology and predominance of soil Streptomyces* pp. 109-121. T. Arai Ed. *Actinomycetes the boundary microorganisms*. Toppan Co. Ud. Tokio.
90. Olaguibel V., Tello M., Velásquez Ll. y col., *Actividad antibacteriana de actinomicetos aislados a partir de sedimentos acuosos del lago Pultoc-Huancavelica*, 2014.
91. Xu LH, Li QR, Jiang Cl. *Diversity of soil Actinomycetes in Yunnan, China*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 244-8,249-253.
92. Aura Salazar y col., *Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de Pereira*.
<file:///C:/Users/ENEYDOHG/Downloads/Dialnet,ActinomicetosAisladosDelSueloDelJardinBotanicoDeLa-4847388.pdf>
93. GI. Cardona, C.P. Peña-Venegas y M. Ruiz-García. *Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr*. *Rev. biol. trop* [online]. 2009, vol.57, n.4 [citado 2013-01-24], pp. 1119-1139. Disponible en:ISSN 00347744.

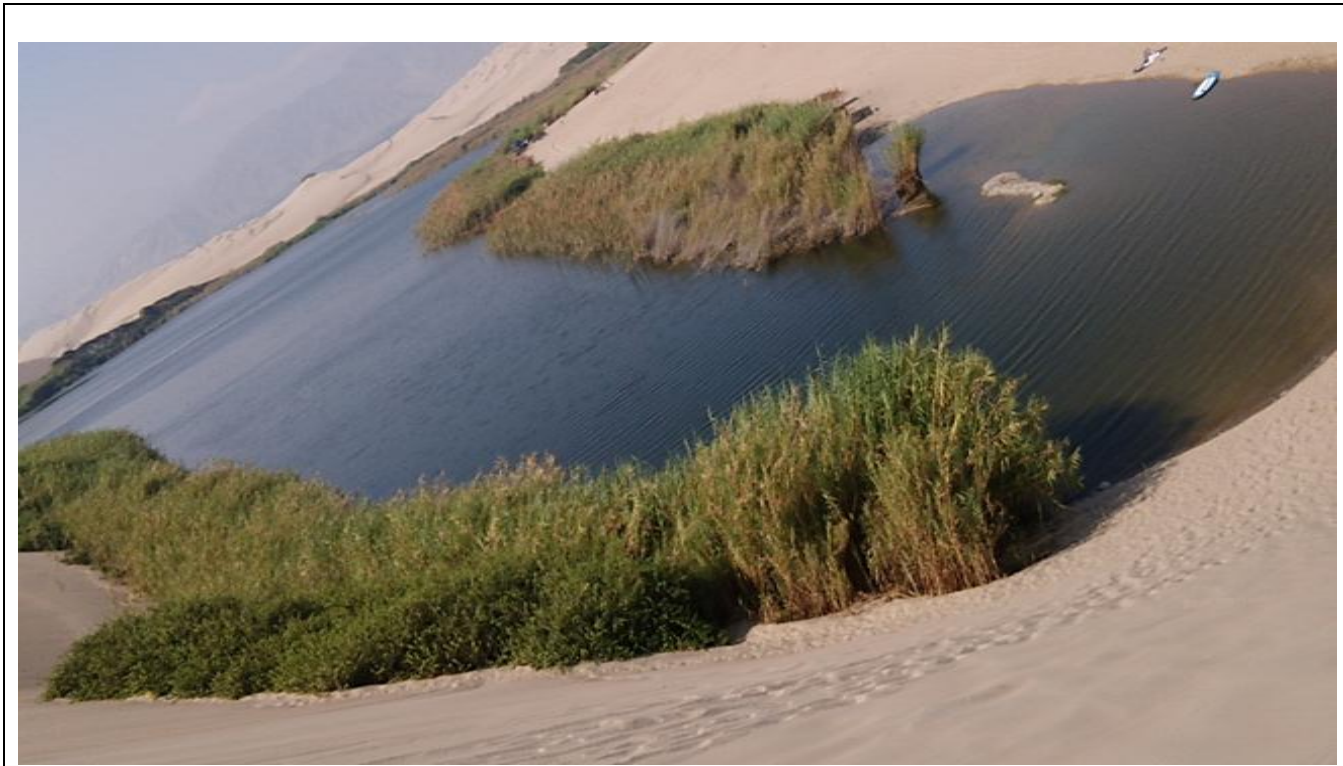
ANEXO N° 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Actividad antibacteriana de sedimentos acuosos aislados de la laguna Moron - Pisco

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	INSTRUMENTOS	FUENTE
<p>¿Cuáles de los actinomicetos aislados a partir de sedimentos acuosos de la laguna Morón de la provincia Pisco – Ica tendrán actividad antibacteriana?</p>	<p>Objetivo General: - Determinar la actividad antibacteriana de los Actinomicetos aislados e identificados a partir de sedimentos acuosos de la Laguna de Morón – Pisco.</p> <p>Objetivos Específicos: - Aislar actinomicetos a partir de sedimentos acuosos de la laguna Morón. - Identificar los Actinomicetos a nivel de género a partir de sedimentos acuosos.</p>	<p>“Los actinomicetos del género <i>Streptomyces</i> aislados e identificados a partir de sedimentos acuosos de la laguna Morón de la provincia de Pisco – Ica tienen actividad antibacteriana”</p>	<p>Variable independiente: - Actinomicetos de la Laguna Morón – Pisco.</p> <p>Variable dependiente: - Actividad antibacteriana</p>	<p>- Actinomicetos. - Control positivo. - Cepas bacterianas tipificadas.</p>	<p>MATERIALES DE LABORATORIO - Fiolas, pipetas volumétricas, probetas, propipetas, baguetas, matraces Erlenmeyer, agitadores de vidrio, vaso de precipitado, tubos de ensayos, gradillas para tubos de ensayos, espátulas de metal, luna de reloj, papel de filtro, papel de aluminio, guantes, mascarillas, algodón, sacabocado, micropipeta, placas Petri.</p> <p>MATERIALES DE CAMPO - Bolsas de papel Kraft, papel Kraft, cooler, bolsas ziploc,</p>	<p>- Laguna Moron. - Sedimentos acuosos.</p>

					<p><i>vasos de polietileno, hilo pabilo, hielo gelatina.</i></p> <p>EQUIPOS</p> <p><i>- Autoclave, Cámara de flujo laminar, Sistema de producción de agua ultra pura, Horno esterilizador, Horno microondas, Incubadora bacteriológica, Refrigeradora, Balanza de precisión, Balanza analítica, Cocina eléctrica, pHmetro, Espectrofotómetro UV, Conductímetro, Estufa esterilizadora.</i></p>	
--	--	--	--	--	---	--

ANEXO N°2: Figura 15. *Proceso de recolección de las muestras*



A. *Ubicación de la Laguna Morón*



B. *Obtención de la muestra de agua*



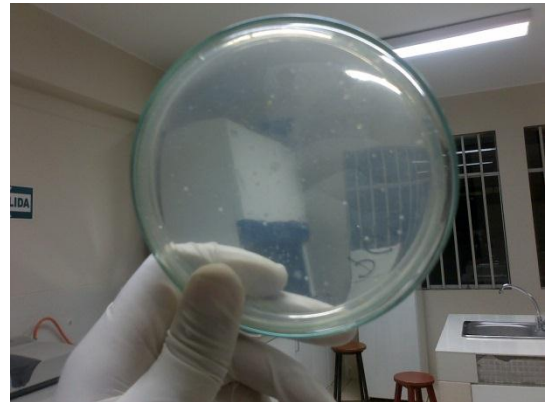
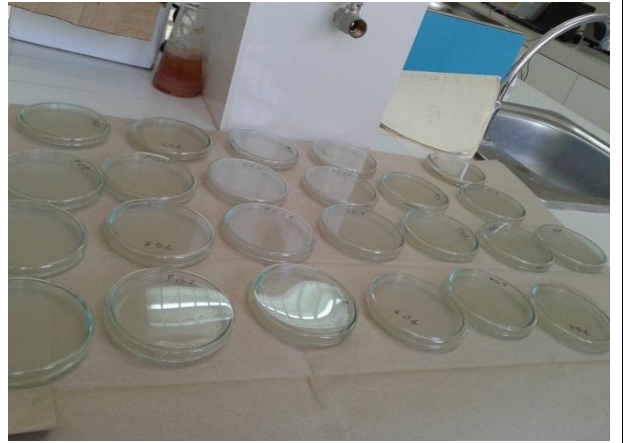
C. *Recolección de las muestras de sedimento acuoso del PG2*



D. *Obtención total de los sedimentos acuoso.*

ANEXO N° 3: Figura 16. *Proceso para el aislamiento de actinomicetos*






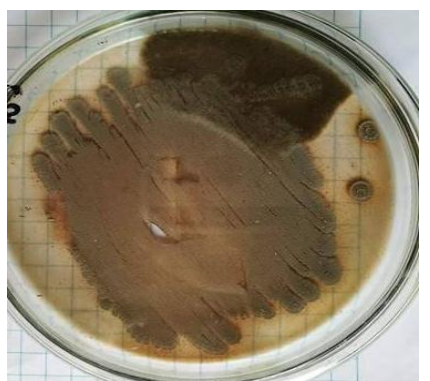


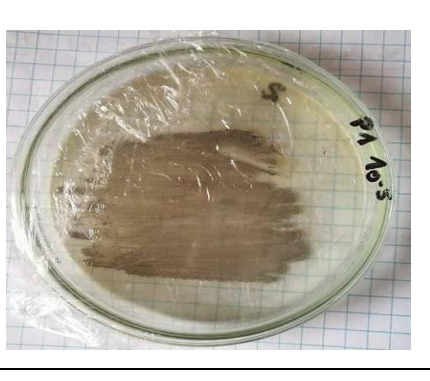




ANEXO N° 4: Figura 17. *Cepas de actinomicetos aislados*



ANEXO N° 5: Figura 18. *Características macroscópicas de las cepas de actinomicetos aislados.*

		
UNSLG P₂ 10⁴	UNSLG P₂10⁴	UNSLG P₅10⁵
		
UNSLG P₁ 10⁴	UNSLG P₅10⁵	UNSLG P₆10⁵
		
UNSLG P₂ 10⁵	UNSLG P₁ 10³	UNSLG P₁ 10⁵

