Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile

Sergio Leiva P^{1a}, Marisa Yáñez S^{1b}, Luis Zaror C^{2c}, Héctor Rodríguez S^{1b}, Héctor García-Quintana^{1c}.

Antimicrobial activity of actinomyces isolated from aquatic environments in Southern Chile

Background: The easy access and inappropriate use of antimicrobials led to selection and spread of resistant microorganisms strains. It is imperative to search for new and more effective antimicrobials. One strategy is the screening of metabolites produced by microorganisms found in the environment. Actinomyces are a potential source of new drugs. **Aim:** To isolate actinomyces from sediments of Chilean rivers and lakes and to screen them for antimicrobial activity against reference bacterial strains and pathogenic fungi. **Material and Methods:** Actinomyces were isolated from sediment samples, using casein-starch agar. The antimicrobial activity against 3 bacterial species and 7 fungal species was tested using the disc diffusion method. For the extraction of active metabolites, culture broths of antagonistic actinomyces were extracted with organic solvents followed by testing the antibiotic activity. **Results:** A total of 62 strains of actinomyces were isolated, mainly *Streptomyces* sp (83.9%). Thirty six strains (58.1%) showed antimicrobial activity, mainly against *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. Some isolates inhibited a wide spectrum of indicator strains, like LRI 4A strain (*Streptomyces* sp) that inhibited *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and 4 filamentous fungi. **Conclusions:** Lakes and rivers of Southern Chile are an important reservoir of antagonistic actinomyces, a potential source of new drugs (Rev Méd Chile 2004; 132: 151-9). (**Key Words:** Actinomycetaceae; Antibiotics, antifungal; Antibiotics, combined; *Streptomyces*)

Recibido el 18 de junio, 2003. Aceptado en versión corregida el 8 de octubre, 2003.

¹Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, ²Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

Trabajo financiado por los Proyectos DID S-1999-33 y DID S-2002-26.

^a Biólogo Marino, Magister en Ciencias

^b Tecnólogo Médico

^c Doctor en Ciencias

Correspondencia a: Héctor García-Quintana. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Casilla 167. Valdivia, Chile. Fax: 63 215295. E mail: sleiva@uach.cl

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 resistentes¹. Se acepta que hay una relación establecida, pero compleja, entre el consumo humano de agentes antimicrobianos y la prevalencia de la resistencia a las drogas en los patógenos. Varios factores influyen en la frecuencia variable de la resistencia en diferentes ecosistemas, tales como: notable plasticidad genética de los microorganismos, reservorios humanos o ambientales donde pueden persistir o ser transmitidos genes de resistencia u organismos resistentes, presiones selectivas por el uso aumentado e inapropiado de antibióticos, así como cambios sociales y tecnológicos que afectan la transmisión de los organismos. Si a esto se suma el aumento de pacientes inmunocomprometidos y de tratamientos con drogas inmunosupresoras, es entendible el incremento y emergencia de infecciones bacterianas y fúngicas²⁻⁴.

Aunque la prevalencia de la resistencia a las drogas en los hongos es baja en relación a las bacterias, se estima que las presiones selectivas llevarán a una disminución en la susceptibilidad y a un aumento en la resistencia a los actuales tratamientos antifúngicos⁵. La más frecuente es la resistencia de *Candida* spp a los azoles, pero la resistencia primaria *in vitro* a anfotericina B también se ha observado en hongos filamentosos emergentes como: *Scedosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus terreus*, en algunas levaduras como *Trichosporon* spp, *Candida lusitanae*, *C. guilliermondi* y con menor frecuencia en *Cryptococcus neoformans*⁶. Actualmente se usan varias estrategias para controlar las micosis resistentes; éstas incluyen: aumento de la intensidad de la dosis de la droga, terapia antifúngica de combinación e inmunomodulación^{6,7}. Sin embargo, la pesquisa de nuevos antifúngicos continúa siendo una necesidad imperiosa. La emergencia de cepas de hongos resistentes ha creado mayor demanda por nuevas drogas, sobre todo para el tratamiento de micosis sistémicas.

La pasada década fue testigo del notable incremento en el arsenal de nuevos antifúngicos, aunque persisten debilidades como: sus espectros, potencias, seguridad y propiedades farmacocinéticas⁸.

Si bien la síntesis química de drogas es una opción válida, la búsqueda de compuestos a partir de microorganismos continúa siendo la principal fuente de nuevos antimicrobianos.

Desde la segunda mitad del siglo XX se ha informado cerca de 50.000 productos naturales provenientes de microorganismos, de los cuales más de 10.000 son biológicamente activos y más de 8.000 son agentes antibióticos y antitumorales⁹. Los principales productores de estos metabolitos son bacterias del suelo del orden Actinomycetales¹⁰, de cuyos cultivos se han aislado importantes agentes terapéuticos, como estreptomycin, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas.

Los actinomycetes son bacterias filamentosas Gram positivas, abundantes en suelos, pero también encontradas en ambientes acuáticos dulceacuícolas y marinos¹⁰⁻¹³. Las bacterias del suelo siguen siendo estudiadas, pero hay una notable merma en el hallazgo de nuevos productos, estimándose que más de 90% de los cultivos bioactivos descubiertos producen agentes ya informados o son variaciones menores de uno ya descrito⁹. Por ello, la pesquisa se ha reorientado hacia otros ambientes, como son: los sedimentos de ríos, lagos y océanos, así como plantas y animales acuáticos, que ofrecen la posibilidad de encontrar cepas silvestres no descritas que produzcan nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente activos^{9,13-17}. La lista de compuestos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos incluyen: antimicrobianos, anticancerígenos y antiinflamatorios, muchos de los cuales pertenecen a clases químicas no descritas en microorganismos terrestres, estando algunos de ellos ya en etapa de evaluación clínica^{9,13,16}.

Debido a que los ecosistemas acuáticos difieren notablemente de los terrestres, 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 actinomycetes en su proceso de adaptación al ambiente acuático, hayan desarrollado habilidades estratégicas que les otorgan mayores probabilidades de supervivencia, entre las cuales la producción de metabolitos bioactivos en contra de otras bacterias, hongos y otros organismos es una probabilidad cierta.

Sin duda que, un uso más racional de los antimicrobianos disponibles demorará o evitará la emergencia de cepas resistentes, lo que está en concordancia con las políticas de uso de antimicrobianos en Chile¹⁸.

El objetivo de esta investigación es explorar la actividad antibacteriana y antifúngica de los actinomicetes de sedimentos de ríos y lagos del sur de Chile. La elección de los lagos se hizo en consideración a factores como: aislamiento geográfico de los sitios de muestreo y poca intervención antrópica en estos lugares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo. Se obtuvieron muestras de sedimentos de 8 esteros y ríos tributarios del lago Riñihue y de 4 lagos de la X Región: Riñihue, Tarahuín, Natri, Tepuhueico (Figura 1). Mediante draga Eckman se recolectó sedimento a diferentes profundidades (1 a 200 m). Los sitios se eligieron por su alejamiento de centros poblados, casi nula contaminación y absoluto desconocimiento de la microbiota que poseen. Las muestras transportadas en frascos estériles y cajas térmicas a 4°C se procesaron

inmediatamente en el Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile.

Aislamiento e identificación de actinomicetes. Las muestras de sedimento se mantuvieron en baño de agua a 50°C por 1 h. Este tratamiento es efectivo para reducir el número de bacterias no deseadas, favoreciendo el crecimiento de los actinomicetes^{19,20}. Diluciones de las muestras se sembraron en triplicado en placas de agar caseína-almidón, suplementadas con nistatina y cicloheximida (25 y 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente) para inhibir el crecimiento de hongos^{20,21} y se incubaron a 20°C por al menos 28 días. Los aislamientos se preservaron a 4°C en agar extracto de levadura-extracto de malta (YMA) inclinado hasta su identificación y ensayos de antagonismo. Las cepas se identificaron hasta nivel de género siguiendo los esquemas de Holt et al²².

Ensayos de actividad antimicrobiana. La actividad antagonica se determinó mediante la técnica de difusión en disco, que consiste en cultivar los actinomicetes en agar YMA por 10 días y luego transferir 3 discos (11 mm de diámetro) sobre agar Mueller Hinton (Difco) previamente sembrados

Figura 1. Localización de los 4 lagos muestreados en la X región.

con suspensiones de aproximadamente 10^6 ufc/mL de las cepas de prueba: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6639 y sobre agar Sabouraud dextrosa (Difco) previamente sembrado con una suspensión de la misma densidad de *Candida albicans* LT1. En placas incubadas a 20°C por 24 h se midió el diámetro de los halos de inhibición. Además, se probó la actividad antifúngica de las cepas de actinomicetes con mayor espectro de actividad sobre aislados clínicos de los hongos filamentosos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* y *Alternaria tenuis* y la levadura *Cryptococcus neoformans*, siguiendo los procedimientos de Zaror y Espinel-Ingroff²³.

Extracción de los compuestos activos y prueba de su actividad antagonista. Las cepas que mostraron mayor actividad se cultivaron en agar YMA a 20°C por 10 días. Trozos del agar con crecimiento, se homogeneizaron e inocularon en 2 L de un medio de producción (extracto de malta 1%, extracto de levadura 0,4%, dextrosa 0,4%, pH=7,2) y se cultivaron bajo agitación continua a 20°C por 20 días. Luego, el caldo se filtró y se trató con 5 solventes orgánicos de polaridad creciente, partiendo por éter de petróleo, luego cloroformo, etilmetilcetona, etilacetato y butanol; posteriormente las fases

orgánicas se evaporaron en rotavapor hasta sequedad y los residuos se resuspendieron en metanol. La extracción de los compuestos activos fue seguida por ensayos de actividad antimicrobiana. Para ello, discos de papel filtro de 6 mm de diámetro se impregnaron con 20 µL del residuo resuspendido de cada extracto y se depositaron sobre placas con agar Mueller Hinton previamente sembradas con las cepas de referencia de *E coli*, *S aureus*, *B subtilis* y agar Sabouraud dextrosa con *C albicans* y *C neoformans*. Como control negativo se impregnaron discos sólo con 20 µL de metanol y se dejaron evaporar previo a su uso.

RESULTADOS

Desde las muestras se obtuvieron 62 cepas de actinomicetes. De ellas, 52 (83,9%) correspondieron a *Streptomyces* spp, en tanto que 3 cepas se identificaron como *Micromonospora* spp (4,8%), 2 cepas como *Micropolyspora* spp (3,2%) y 5 no se lograron identificar (8,1%). A cada una se le asignó una clave y se traspasaron a cepario. Esta clave corresponde a las siglas LRI-Nº de aislamiento o AR-Nº de aislamiento.

De las 62 cepas aisladas, 36 (58,1%) tuvieron actividad antimicrobiana. El análisis del espectro antimicrobiano proporciona información sobre los patrones de inhibición (Figura 2). La actividad se

Figura 2. Especies bacterianas y fúngicas inhibidas por Actinomicetes acuáticos. EC, *Escherichia coli* ATCC 25922; SA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; BS, *Bacillus subtilis* ATCC 6639; CA, *Candida albicans* LT1.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de Actinomycetes acuáticos bioactivos contra cepas de referencia

Cepa	Identificación	Tapiz indicador			
		<i>S aureus</i>	<i>B subtilis</i>	<i>E coli</i>	<i>C albicans</i>
LRI 1A	<i>Micropolyspora</i> sp	0	25	24	0
LRI 2A	<i>Micromonospora</i> sp	0	0	0	15
LRI 4A	<i>Streptomyces</i> sp	0	20	0	40
LRI 5A	<i>Streptomyces</i> sp	21	22	0	15
LRI 9A	<i>Streptomyces</i> sp	14	0	0	0
LRI 10A	<i>Streptomyces</i> sp	15	0	0	0
LRI 13A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	15
LRI 14A	<i>Streptomyces</i> sp	0	15	0	20
LRI 15A	<i>Streptomyces</i> sp	0	24	24	16
LRI 16A	<i>Streptomyces</i> sp	0	28	30	0
LRI 22A	<i>Streptomyces</i> sp	0	17	0	0
LRI 25A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	20	0
LRI 26A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	26	0
LRI 29A	<i>Streptomyces</i> sp	25	0	28	0
LRI 36A	<i>Streptomyces</i> sp	18	0	0	0
LRI 39A	<i>Streptomyces</i> sp	0	27	0	0
LRI 41A	<i>Streptomyces</i> sp	0	23	0	0
LRI 42A	<i>Streptomyces</i> sp	0	30	0	0
LRI 46A	<i>Streptomyces</i> sp	0	29	25	0
LRI 48A	<i>Streptomyces</i> sp	0	15	0	0
LRI 49A	<i>Streptomyces</i> sp	0	16	0	0
LRI 50A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	18
LRI 51A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	17
LRI 53A	<i>Streptomyces</i> sp	0	27	0	0
LRI 55A	<i>Streptomyces</i> sp	0	20	0	0
LRI 56A	<i>Streptomyces</i> sp	0	20	0	0
LRI 60A	<i>Streptomyces</i> sp	0	25	0	0
LRI 61A	<i>Streptomyces</i> sp	0	25	0	0
LRI 64A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	16
LRI 65A	<i>Streptomyces</i> sp	0	18	0	0
LRI 67A	<i>Streptomyces</i> sp	19	0	0	0
LRI 69A	<i>Streptomyces</i> sp	0	25	0	0
AR 131	<i>Streptomyces</i> sp	29	20	15	18
AR 163	<i>Streptomyces</i> sp	0	17	0	0
AR 165	<i>Streptomyces</i> sp	0	18	0	0
AR 213	<i>Streptomyces</i> sp	18	0	0	0
Nº casos positivos		8	23	8	10

La actividad antimicrobiana se expresa como el diámetro del halo de inhibición (mm) alrededor de un disco de agar con la cepa viva después de una incubación a 23°C por 16-18 h.

dirigió principalmente contra *B subtilis*, que fue inhibido por 23 cepas (37,1%). En contraste, sólo 8 cepas (12,9%) presentaron actividad contra *E coli*.

El detalle de la actividad antimicrobiana de 36 cepas de actinomycetes sobre las tres cepas bacterianas y una cepa fúngica se muestra en la Tabla 1.

Se destacan los *Streptomyces* nativos: LRI 5A que inhibió tanto a las bacterias Gram positivas *B subtilis* y *S aureus* así como al hongo *C albicans*; LRI-15A, LRI-16A, LRI-29A y LRI-46A inhibieron tanto a Gram positivos como Gram negativos y AR-131 presentó actividad contra todas las cepas indicadoras. Por su parte la *Micropolyspora* LRI-1A actuó sobre *B subtilis* y *E coli*.

Se escogieron 13 cepas con el mayor espectro de actividad para determinar su efecto contra hongos filamentosos y levaduriformes. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Bajo las condiciones experimentales utilizadas, los únicos aislados que presentaron actividad fueron LRI-5A que inhibió a *A tenuis*, LRI-4A con moderada actividad contra *A tenuis* y *T rubrum* y fuerte antagonismo contra *M canis* y *T mentagrophytes* y la cepa LRI-15A que inhibió a *C neoformans*. *A fumigatus* nunca fue inhibida.

Los extractos de 13 cepas elegidas obtenidos con distintos solventes orgánicos se ensayaron contra 5 cepas de prueba. La actividad de estos

extractos se muestra en la Tabla 3. De un total de 325 ensayos, 96 (29,5%) fueron positivos inhibiendo a alguna de las 5 cepas indicadoras. La mayor actividad de los extractos fue contra Gram positivos, siendo *B subtilis* la cepa más sensible con 45 ensayos positivos (46,9% del total de ensayos positivos). Por el contrario, *C neoformans* y *C albicans* fueron las más resistentes, con sólo uno y tres ensayos positivos, respectivamente. Los extractos más activos fueron los obtenidos con etilmetilcetona, con 28 ensayos positivos (29,2% del total de ensayos positivos), mientras que las fracciones menos activas fueron las provenientes de cloroformo con sólo 11,5% de actividad.

DISCUSIÓN

En esta investigación se logró el aislamiento de actinomicetes 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,

Tabla 2. Actividad antifúngica de 13 cepas de Actinomicetes seleccionados

Cepa	Identificación	Tapiz indicador					
		AF	AT	MC	TM	TR	CR
LRI 1A	<i>Micropolyspora</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 4A	<i>Streptomyces</i> sp	0	20	45	60	20	0
LRI 5A	<i>Streptomyces</i> sp	0	20	0	0	0	0
LRI 14A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 15A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	40
LRI 16A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 25A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 26A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 46A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 55A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 56A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 60A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0
LRI 61A	<i>Streptomyces</i> sp	0	0	0	0	0	0

La actividad antimicrobiana se expresa como el diámetro del halo de inhibición (mm) alrededor de un disco de agar con la cepa viva después de una incubación a 23°C por 16-18 h. AF, *Aspergillus fumigatus*; AT, *Alternaria tenuis*; MC, *Microsporium canis*; TM, *Trichophyton mentagrophytes*; TR, *Trichophyton rubrum*; CR, *Cryptococcus* spp.

Tabla 3. Número de ensayos positivos con los extractos de 13 cepas de *Actinomycetes* sobre 3 especies bacterianas y 2 fúngicas (325 ensayos)

Cepa indicadora	Extractos					Total positivos	
	EP	CL	ET	EA	BU	Nº	%
<i>S aureus</i>	8	6	10	11	5	40	61,5
<i>B subtilis</i>	11	3	12	11	8	45	69,2
<i>E coli</i>	0	0	6	1	0	7	10,8
<i>C albicans</i>	2	1	0	0	0	3	4,6
<i>C neoformans</i>	0	1	0	0	0	1	1,5
Total	21	11	28	23	13	96	29,5

ET, éter de petróleo; CL, cloroformo; ET, etilmetilcetona; EA, etilacetato; BU, butanol.

Tarahuín y Tepuhueico). Trabajos anteriores de Roubillard²⁴, Lazo²⁵ y García-Quintana et al²⁶, entre otros, habían demostrado la presencia de actinomycetes en la microbiota de suelos y aguas de diversas zonas de Chile. En otros países diversos investigadores habían informado el hallazgo de actinomycetes en suelos y aguas, evaluando su potencial productor de agentes bioactivos^{17,27-30}.

Según Nolan y Cross³¹ la disminución de la tasa de descubrimiento de nuevas cepas productoras a partir de cepas terrestres, incitó a explorar nuevos hábitats con el objeto de aislar cepas no descritas con antelación y que pudiesen producir metabolitos con estructuras y actividades diferentes que se aprovecharan en el área terapéutica.

Del total de aislamientos obtenidos, 62 cepas fueron identificadas como actinomycetes y de ellas 52 correspondieron a *Streptomyces* spp (83,9%) lo cual concuerda con lo informado en otras latitudes para ambientes dulceacuícolas^{10,17,32}. También se identificaron tres cepas como *Micromonospora* spp (4,8%) y dos como *Micropolyspora* spp (3,2%). Las cinco cepas restantes no pudieron ser identificadas, pero presumiblemente podrían corresponder a géneros de actinomycetes signados como raros, como: *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* o *Streptosporangium*. El bajo número de aislamiento de estos actinomycetes raros se debería a que su aislamiento implica: desarrollo de medios de

cultivo especializados, empleo de pretratamientos de la muestra y tiempos de incubación más prolongados o bien necesidad del uso de antibacterianos que inhiban selectivamente el crecimiento de bacterias competidoras, incluyendo otros actinomycetes³¹.

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, las candidiasis y micosis causadas por hongos dematiáceos constituyen enfermedades emergentes y en general tienen creciente importancia como agentes oportunistas en pacientes inmunocomprometidos e incluso inmunocompetentes, a lo cual hay que agregar el incremento de la resistencia al escaso número de antifúngicos existentes³³.

La actividad de los actinomycetes aislados aquí sobre *S aureus* (12,9%) parece muy exigua en relación a lo reportado por Pisano et al, quienes encontraron 50% de actividad de actinomycetes marinos contra *S aureus*³⁴. En relación al porcentaje de Actinomycetes activos contra *E coli* (12,9%), se reafirma lo comunicado por otros autores^{34,35}. Con respecto a la actividad antifúngica, Pisano et al³⁶ informaron que los aislamientos de actinomycetes marinos eran activos contra levaduras (*Candida kruzei* 49% y *C albicans* 32%)

y hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Fusarium moniliforme*, atribuyendo la actividad antifúngica principalmente a polienos como heptaenos. Otros autores como Jiang y Xu¹⁷ en lagos de Yunan en China y García-Quintana et al²⁶ en suelos de la X región de Chile, informaron acerca de la actividad en contra de hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Trichophyton mentagrophytes*.

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*. Ello puede significar que el agente activo no es muy específico en cuanto a su diana, ya que actúa igualmente sobre procariontes y eucariontes, o bien, que dichas cepas nativas elaboren más de un producto, cada uno de los cuales puede tener un sitio blanco específico distinto.

También es destacable la actividad que mostró el aislamiento LRI-2A, correspondiente a una

cepa de *Micromonospora* spp, el cual actuó sobre *C albicans*. Recientemente se ha informado que a partir del género *Micromonospora* se han obtenido importantes antibióticos tales como aminociclitos (eg gentamicinas y sisomicinas), macrólidos (mycinamicina y rosamicina) y antibióticos polisacáridos (everninomicina)³⁷.

Del total de cepas activas se eligieron 13 para la extracción de los principios activos (12 *Streptomyces* spp y una *Micropolyspora* spp). El extracto que presentó mayor actividad fue el obtenido con etilmetilcetona con 29,2% del total de los casos positivos, en tanto que la menos activa fue la extraída con cloroformo (11,5%). Estos ensayos constituyen un paso previo a la purificación y posterior determinación de la estructura química del metabolito¹³.

Futuros estudios de este tipo señalarán si el antagonismo encontrado contra bacterias y hongos se debe a nuevos antibióticos.

REFERENCIAS

- KUNIN CM. Resistance to antimicrobial drugs a worldwide calamity. *Ann Int Med* 1993; 118: 557-61.
- NEU HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992; 257: 1064-73.
- COHEN ML. Epidemiology of drug resistance: Implications for a post antimicrobial era. *Science* 1992; 257: 1050-5.
- CONTRERAS L, FICA A, FIGUEROA O, ENRÍQUEZ N, URRUTIA P, HERRERA P. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina y su asociación con factores clínicos y epidemiológicos. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 26-34.
- STEPHENSON J. Investigators seeking new ways to stem rising tide of resistant fungi. *J Am Med Ass* 1997; 277: 5-6.
- KONTOYIANNIS DP, LEWIS RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135-44.
- HUDSON MMT. Antifungal resistance and over the counter availability in the UK: a current perspective. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 345-50.
- BONN D. New antifungals make mayhem for mycoses. *Lancet* 1997; 350: 870.
- FENICAL W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem Rev* 1993; 93: 1673-83.
- CROSS T. Aquatic Actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of Actinomycetes in aquatic habitats. *J Appl Bacteriol* 1981; 50: 397-423.
- NIEMI RM, KNUTH S, LUNDSTRÖM K. Actinomycetes and fungi in surface waters and in potable water. *Appl Environ Microbiol* 1982; 43: 378-88.
- ZAITLIN B, WATSON SB, DIXON J, STEEL D. Actinomycetes in the Elbow river basin, Alberta, Canada. *Water Qual Res J Canada* 2003; 38: 115-25.
- JENSEN PR, FENICAL W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 559-84.
- LEIVA S, GARCÍA-QUINTANA HG, ZAROR L. Actinomycetes acuáticos: una revisión sobre su aislamiento, distribución y potencial antibiótico. *Medio Ambiente* 2000; 13: 80-8.

15. HENTSCHEL U, SCHMID M, WAGNER M, FIESELER L, GERNERT C, HACKER J. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Ecol* 2001; 35: 305-12.
16. CRAGG GM, NEWMAN DJ. Medicinals for the millenia. The historical record. *Ann NY Acad Sci* 2001; 953: 3-25.
17. JIANG CL, XU LH. Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 249-53.
18. BAVESTRELLO L, CABELLO A, CASANOVA D. Impacto de medidas regulatorias en la tendencia de consumo comunitario de antibióticos en Chile. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 1265-72.
19. PISANO MA, SOMMER MJ, LÓPEZ M. Application of pretreatments for the isolation of bioactive Actinomycetes from marine sediments. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986; 25: 285-8.
20. TAKISAWA M, COLWELL RR, HILL RTT. Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 997-1002.
21. KÜSTER E, WILLIAMS ST. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature* 1964; 202: 928-9.
22. HOLT JG, KRIEG NR, SNEATH PHA, STALEY JT, WILLIAMS SP. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore 1994.
23. ZAROR L, ESPINEL-INGROFF A. Pruebas de susceptibilidad fúngica frente a antimicóticos. *Bol Micol* 1989; 4: 77-90.
24. ROUBILLARD S. Separación y purificación de un antibiótico producido por *Streptomyces* sp. *Anal Quím Farm* 1967; 9: 101-4.
25. LAZO W. Notas micológicas y bacteriológicas. Basidiomycetes y *Streptomyces* de Chile. *Bol Micol* 1991; 6: 41-2.
26. GARCÍA-QUINTANA HG, ZAROR L, LEIVA S. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. *Rev Méd Chile* 1997; 125: 1157-64.
27. CRAWFORD DL, LYNCH JM, WHIPPS JM, OUSLEY MA. Isolation and characterization of Actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 3899-905.
28. XU LH, LI QR, JIANG CL. Diversity of soil Actinomycetes in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 244-8.
29. LEE JY, HWANG BK. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol* 2002; 48: 407-17.
30. BARAKATE M, OUHDOUCH Y, OUFDOU K, BEAULIEU C. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J Microb Biot* 2002; 18: 49-54.
31. NOLAN RD, CROSS T. Isolation and screening of actinomycetes. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarsky M, ed. *Actinomycetes in biotechnology*. San Diego, Calif.: Academic Press Inc, 1988; 1-32.
32. WOHL DL, McARTHUR JV. Actinomycete flora associated with submersed freshwater macrophytes. *FEMS Microbiol Ecol* 1998; 26: 135-40.
33. PUJOL I, AGUILAR C, GENE J, GUARRO J. *In vitro* antifungal susceptibility of *Alternaria* spp and *Ulocladium* spp. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 337-8.
34. PISANO MA, SOMMER MJ, BRANCACCIO L. Isolation of bioactive Actinomycetes from marine sediments using rifampicin. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; 31: 609-12.
35. BARCINA I, IIRIBERRI J, EGEA L. Enumeration, isolation and some physiological properties of Actinomycetes from sea water and sediment. *System Appl Microbiol* 1987; 10: 85-91.
36. PISANO MA, SOMMER MJ, TARAS L. Bioactivity of chitinolytic Actinomycetes of marine origin. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992; 36: 553-5.
37. Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 78: 399-405.

Agradecimientos

Deseamos agradecer al Sr. Raúl Arriagada del Instituto de Zoología de la Universidad Austral de Chile, por su valiosa ayuda en la recolección de las muestras en terreno. Este estudio fue financiado por los proyectos DID S-1999-33 y DID S-2002-26.